Série A, n°4520
N° d'ordre :
5367

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame CHÉDRU, née FOURRIER Josette

PREMIÈRE THÈSE

La perméabilité des globules rouges humains aux ions orthophosphates

DEUXIÈME THÈSE

Calcium et Mitochondries

Soutenues le 28 Juin 1965 devant la commission d'examen

M. THOMAS — *Président*

M. STOLKOWSKI, M. CARTIER — *Examinateurs*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0036

A, n° 4520
° d'ordre :
5367

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

E GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame CHÉDRU, née FOURRIER Josette

PREMIÈRE THÈSE

La perméabilité des globules rouges humains aux ions orthophosphates

DEUXIÈME THÈSE

Calcium et Mitochondries

Soutenues le 1965 devant la commission d'examen

M. THOMAS *Président*
M. STOLKOWSKI } *Examinateurs*
M. CARTIER }

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

BRELOT	T	Analyse supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et Cristallog.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
N...	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du globe.
Mlle COUSIN	T	Biol. animale (S.P.C.N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et Sédim. (Orsay).
GAUTHERET	T	Biol. végétale (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie vég. (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS ..	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du globe.
L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DU BREIL	T	Arithmét. et Théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie org. et structur.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théorie physique.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minérallog. et Cristallog.
J.-P. MATHIEU ...	T	Physique optique.
COUTEAUX	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie.
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et Physique mathématiq.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et Intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. aéron.).
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUE	T	Statistique mathématique.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie vég. appliqu.
MARÉCHAL	T	Optique théor. et appliq.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON..	T	Physiol. de la nutrition.
LELONG	T	Application de l'analyse à la Géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comp.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANCON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD	T	Géogr. phys. et Géolog.
DODEMENT	T	Mathématiques (M.G.P.).
PISOT	T	Technique mathémat. de la Physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT ..	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.C.P.).
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechn. générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergie (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY....	T	Biologie végét. (P.C.B.).
PANNETIER	T	Chimie générale.
BRUN	T	Mécanique des fluides I.
LEDERER	T	Chimie biolog. (Orsay).
Mme DUBREUIL....	T	Mathématiques (Agrég.).
Mme LELONG.....	T	Mathémat. II (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
MICHEL A.	T	Chimie minér. (Orsay).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Physiologie végétale.
CASTAING	T	Physique II thermod. (Orsay).
CURIEN	T	Minérallog. et Cristallog.
MOYSE	T	Physiol. végétale (Orsay).
Mme CHARNIAUX-COTTON	T	Evolution des êtres organisés.
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie quantique.
TEILLAC	T	Phys. nucl. et Radioact. (Orsay).
TONNELAT	T	Biolog. physico-chimique (Orsay).
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (Orsay).

FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biologie végét. (S.P.C.N.) (Orsay).
ROLLET	T	Chimie minérale.
Mlle JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).
DENY	T	Mathém. génér. (Orsay).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mlle ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie.
FRIEDEL	T	Phys. des solides (Orsay).
M. JULIA	T	Etudes des moléculaires complexes.
LENDER	T	Biol. animale (S.P.C.N.) (Orsay).
MAGAT	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiol. animale (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique.
LEMÉE	T	Ecologie végét. (Orsay).
GUÉRIN	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay).
CHATELET	T	Chimie (P.C.B.).
JEAN	T	Physiol. nucl. (Orsay).
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.).
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).
BERTEIN	T	Electronique (Orsay).
BOUISSIÈRES	T	Radiochimie.
Mme COUTURE	T	Thermodyn. et Mécanique physique.
ELLEMBERGER	T	Géol. des grandes régions du globe (Orsay).
FRANC	T	Biologie animale (P.C.B.).
SCHNELL		Botanique tropicale.
STOLKOWSKI	T	Physiologie végétale.
ACHER	T	Chimie biologique.
BAUDOIN	T	Biologie anim. (P.C.B.).
BEAUMONT		Biol. animale (S.P.C.N.).
BLAMONT		Géophysique ionosphère.
BOUREAU	T	Botanique.
CURIE D.		Physique (M.G.P.).
DURAND-DELGA	T	Géologie.
FRÉON	T	Chimie organ. (Orsay).
HELLER	T	Physiologie végétale.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T	Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN	T	Physique électricité.
DAUDEL	T	Mécanique ondulat. appl. à la chimie théor. et et à la phys. nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biolog. végét. (S.P.C.N.).
Mme CHOQUET		Mécanique analytique et mécanique céleste.
Mlle VEIL	T	Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
BROCHARD	T	Phys. (P.C.B.). (Orsay).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques I (Orsay).
MAZET	T	Mécanique gén. (Orsay).
CAIRE		Géograph. physique et géographie dynamique.
COMOLET		Mécanique des fluides.
CORABŒUF	T	Physiol. animale (Orsay).
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie anim. (P.C.B.).
JULLIEN J.		Chimie (S.P.C.N.) (Orsay)
MALGRANGE	T	Technique mathém. de la physique (Orsay).
OLIVIER		Antropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE	T	Phys. (E.N.S.) (Orsay).
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay).
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).
SAMUEL	T	Math. (E.N.S.) féminines.
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay).
THIRY	T	Mécanique céleste.
ABELES		Physique (S.P.C.N.).
AMAT	T	Physique (P.C.B.).
AUBOIN	T	Géologie.
Mme BENOIT-GUEUTAL	T	Physique nucl. et radio-activité (Orsay).
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
BRUHAT	T	Mathématiques (M.P.C.).
BRUNN	T	Géologie histor. (Orsay).
CHABBAL	T	Phys. (M.G.P.) (Orsay).
DEHEUVELS	T	Mathémat. propédeutique.
D'ESPAGNAT	T	Physique théor. (Orsay).
FURON	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme GANS	T	Génétique.
GENEVES		Biologie végét. (P.C.B.).
GUILBERT		Phys. (C.U.S. Orléans).
HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale.
LIONS	T	Analyse numérique.
MAITTE	T	Chimie (P.C.B.).
MEYER		Physique propédeutique.
NICOLAS		Géologie appliquée.
PANIGEL		Biologie générale.
RAVIER		Pétrographie.
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides.
ROUBINE		Electronique.
SILBER	T	Chimie (P.C.B.).
UEBERSFELD	T	Electronique.
YVON	T	Théories physiques.
HERVÉ	T	Mathématiques.
NÉRON	T	Math. (M.C.P.) (Orsay).
Mme PECKER-WIMEL	T	Astrophysique.
BALKANSKY		Physique (M.P.C.).
LE CORRE	T	Electricité.
DELCROIX	T	Physique théor. (Orsay).
GOURDIN		Physique théor. (Orsay) des hautes énergies.
LEHMANN	T	Phys. expérim. des hautes énergies.
NATAF	T	Physique nucl. et radio-activité (Orsay).
ECHALIER		Biologie animale (P.C.B.).
BARRAUD		Physiologie cellulaire.
LIORET		Physiol. végét. (Orsay).
DARS		Géologie structurale et Géologie appliquée.
CAMEFORT	T	Botanique (Agrégation).

VICHNIEWSKY ...	T	Mécanique industrielle.	VILKAS		Chimie (C.P.E.M.).
BLAQUIÈRE		Electronique (Orsay).	Mlle FICINI.....		Chimie (C.P.E.M.).
ARNOUS	T	Physique théorique.	LEQUEUX		Astronomie.
TATIBOUET		Chimie (C.S.U. Orléans).	COHEN-TANNOUDJI		Physique (M.P.C.).
MALLIAVIN	T	Math. propéd. (Orsay).	TAVERNIER		Physique (C.P.E.M.).
GAUDEMAR		Chimie propédeutique.	Mme ROIZEN.. ...		Physique (C.P.E.M.).
PEREZ Y JORBA ..		Phys. expér. des hautes énergies (Orsay).	DURAND M.		B.A. (S.P.C.N.).
			PASCAUD		Physiologie.
DAVID	T	Chimie (Agrég. Orsay).	Mme PETIT.....		B.A. (C.P.E.M.).
BROUSSE	T	Mécanique théorique.	BROUSSE		Géologie (Orsay).
ROSCH	T	Astronomie.	CAGNIAC		Physique (Agrég. Orsay).
GUY	T	Physique expérimentale.	LEBERRE		Zoologie (Orsay).
LAZARD		Mathématiques (M.P.C.).	SCHEFFER		Microbiologie (Orsay).
MOREL Pierre.....		Physique (M.P.C.).	de GENNES		Phys. des solides (Orsay).
ARSAC		Programmation.	RIOU		Physique nucléaire expér. (Orsay).
LEFEBVRE		Chimie (M.P.C.).			
CHAPEVILLE		Biochimie.	CLAUSER		Chimie biolog. (Orsay).
BENOIT		Physique (C.P.E.M.).	CHEVALIER		Physiol. animale (Orsay).
RIO		Chimie (C.P.E.M.).	JANCOVICI		Physique atom. (Orsay).
JAUZEIN		Géologie (E.N.S.).	FALK-VAIRANT ...		Physique nucl. (Orsay).
PREVOST Georges..		B.V. (C.P.E.M.).	FETIZON		Chimie propéd. (Orsay).
FAVARD P.		B.A. (C.P.E.M.).	CERF		Mathématiques (Orsay).

Secrétaire Général ..... R. POULLAIN

✶

LA PERMÉABILITÉ DES GLOBULES ROUGES HUMAINS AUX IONS ORTHOPHOSPHATES

✳

✳ ✳ ✳

Ce travail a été effectué en majeure partie au laboratoire de l'Ecole Nationale de Médecine de ROUEN.

— Que Monsieur le Professeur THOMAS veuille bien trouver ici l'expression de toute ma vive gratitude. Il a accepté la présidence du jury de cette thèse, et son accueil si bienveillant m'a profondément touchée.

— Monsieur le Professeur STOLKOWSKI a bien voulu me faire l'honneur de siéger dans mon jury de thèse. Je le prie d'agréer mes très sincères remerciements.

— J'exprime à Monsieur le Professeur CARTIER, mes sentiments de profonde reconnaissance. Tout d'abord, parce qu'il a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire après une longue interruption de toute activité scientifique, et surtout parce qu'il m'a patiemment guidée dans l'élaboration d'un travail qui lui doit beaucoup. Sa maîtrise à apporter de la clarté dans les problèmes les plus complexes, son dynamisme, la cordiale atmosphère qu'il sait créer autour de lui, resteront pour moi des exemples et d'inoubliables souvenirs. Je lui adresse l'expression de ma respectueuse admiration.

✶ ✶
✶

— Je voudrais qu'il me fût permis de rappeler ici ce que je dois à mon premier maître, Monsieur le Professeur TERROINE. Ses cours m'ont laissé une impression ineffaçable et je n'ai pas oublié non plus quel enthousiasme pour la recherche il savait communiquer à ses collaborateurs. Plus récemment, ses encouragements amicaux m'ont incitée à reprendre le travail de laboratoire. Je suis heureuse de trouver aujourd'hui l'occasion de lui adresser l'hommage de ma reconnaissance et l'assurance de ma respectueuse affection.

✶ ✶
✶

✳ ✳ ✳

— Je dois à la bienveillance de Monsieur le Professeur MATRAY d'avoir terminé ce travail dans son laboratoire, je lui en suis très reconnaissante.

— Je remercie mes camarades de laboratoire de ROUEN et de PARIS, pour l'aide qu'ils m'ont apportée avec tant de cordialité.

— Mes remerciements vont aussi au Docteur ROPARTZ et au Centre Régional de Transfusion sanguine de ROUEN qui ont très obligeamment fourni les échantillons de sang, et au Service de Radiologie de l'Hôtel-Dieu qui s'est chargé du développement des autoradiogrammes.

✳ ✳ ✳

SOMMAIRE

* * *

PAGES

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

—

STRUCTURE DU GLOBULE ROUGE ET MÉCANISME DE LA PERMÉABILITÉ IONIQUE

CHAPITRE I 9

COMPOSITION CHIMIQUE ET STRUCTURE DE LA MEMBRANE

A. — Composition chimique :

I - les protéines de structure.
II - les protéines enzymatiques.
III - les lipides.
IV - les cations.

B. — Structure.

CHAPITRE II 25

COMPOSITION CHIMIQUE DU MILIEU INTRAGLOBULAIRE

CHAPITRE III 28

L'ÉQUILIBRE DE RÉPARTITION DES IONS

I - Les mécanismes généraux de la perméabilité.
II - La perméabilité aux ions phosphates.
III - Le métabolisme énergétique du globule rouge.

PAGES

DEUXIÈME PARTIE

—

EXPOSÉ ET DISCUSSION DES TECHNIQUES

CHAPITRE I 44

LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

I - Les techniques expérimentales.
II - Les techniques de dosage :
— la séparation des phosphodérivés
la mesure des activités des phosphores α, β, γ de ATP, ADP
— la séparation des esters phosphoriques par chromatographie.

CHAPITRE II 57

DISCUSSION DES TECHNIQUES

I - Discussion des techniques expérimentales.
II - Discussion des techniques analytiques.

*

TROISIÈME PARTIE

—

EXPOSÉ DES RECHERCHES PERSONNELLES SUR LE MÉCANISME DE LA PERMÉABILITÉ AUX IONS ORTHOPHOSPHATES

CHAPITRE I 68

LA FORMULE PHOSPHORÉE DES GLOBULES ROUGES

I - Le compartiment intracellulaire minéral.
II - Le compartiment intracellulaire organique.

CHAPITRE II 74

LA CINÉTIQUE DE L'ENTRÉE DES IONS PHOSPHATES

I - En fonction de la durée de l'incubation :
— cinétique globale
— répartition intracellulaire du ^{32}P
II - En fonction de la température.

PAGES

CHAPITRE III 87

LE MÉCANISME DE L'ENTRÉE DES IONS ORTHOPHOSPHATES

I - La diffusion facilitée :

— influence de la concentration

— influence de substances de structure apparentée.

1 - SO_4 =

2 - ASO_4 ≡

II - Le transport actif :

A - Niveau de glycémie variable.

B - Modification de la glycolyse en fonction du pH.

C - Inhibition de la glycolyse :

1 - MIA

2 - Fluorure

3 - Arséniate

D - Déviation de la glycolyse par le bleu de méthylène.

✷

DISCUSSION 133

CONCLUSIONS 142

✷

ABRÉVIATIONS

ATP : acide adénosine triphosphorique
ADP : acide adénosine diphosphorique
AMP : acide adénosine monophosphorique
GTP : acide guanosine triphosphorique
UTP : acide uridine triphosphorique
UDP : acide uridine diphosphorique
UDPG : uridine diphosphoglucose
DPN : diphosphopyridine nucléotide
DPNH : diphosphopyridine nucléotide réduit
TPN : triphosphopyridine nucléotide
TPNH : triphosphopyridine nucléotide réduit
1-6 FDP : 1-6 fructose diphosphate
G-1-P : glucose-1-phosphate
G-6-P : glucose-6-phosphate
1-6-GDP : 1-6-glucose diphosphate
3 PG : 3-phosphoglycérate
2 PG : 2-phosphoglycérate
1-3 DPG : 1-3 diphosphoglycérate
2-3 DPG : 2-3 diphosphoglycérate
R-5-P : ribose-5-phosphate
SH-7-P : sédoheptulose-7-phosphate
Ph° dérivés : Phosphodérivés
HK : hexokinase
PFK : phosphofructokinase
PGK : phosphoglycérate kinase
PEPK : phosphoénolpyruvate kinase
PRPP : phosphorybosylpyrophosphate
Hb : hémoglobine
HbO_2 : oxyhémoglobine
MHb : méthémoglobine
GSSG : glutathion (forme oxydée)
GSH : glutathion (forme réduite)
CN^- : cyanures
DNP : dinitrophénol
EDTA : éthylène diamine tétracétate
MIA : monoiodacétate
PCMB : parachloromercuribenzoate
FNa : fluorure de sodium
B.M. : bleu de méthylène
TCA : acide trichloracétique
PCA : acide perchlorique
γ : μ g
A.S. : activité spécifique
G.R. : globule rouge

INTRODUCTION

Parmi les éléments minéraux intracellulaires, les orthophosphates jouent un rôle de première importance : indispensables au métabolisme de la cellule, leur concentration intracellulaire constitue un des principaux éléments de la régulation primaire du métabolisme.

Et cependant, si actuellement nous pouvons nous faire une représentation assez précise des mécanismes du transport des autres anions et cations, de nombreuses incertitudes demeurent sur les moyens dont dispose la cellule pour s'approvisionner en ions PO_4^{---}. Ici, le problème est, en effet, plus compliqué que pour les autres anions. Les ions Cl^-, CO_3H^- ou SO_4^{--} pénètrent dans la cellule et s'y répartissent sans engager de combinaisons organiques. La cinétique de la perméabilité et l'équilibre de répartition suffisent généralement à prouver que le passage à travers la membrane met en jeu un transport passif par diffusion, qui s'effectue dans le sens du gradient de potentiel électro-chimique, et dont le niveau est réglé par un équilibre de GIBBS-DONNAN.

Le problème est bien plus complexe lorsqu'il s'agit de définir les mécanismes de perméabilité aux ions PO_4^{---}. Le niveau intracellulaire de ces ions est le reflet d'un double équilibre :

— d'une part entre les orthophosphates intra- et extracellulaires.

— d'autre part, entre les ions PO_4^{---} intracellulaires (compartiment intracellulaire minéral) et l'ensemble des phosphodérivés qui apparaissent et disparaissent au cours de la vie de la cellule (compartiment intracellulaire organique) (Fig. 1).

Ces deux équilibres s'établissent avec des vitesses différentes qui dépendent, directement ou indirectement, de l'intensité du métabolisme de la cellule.

D'une manière très schématique, pour expliquer la perméabilité de la membrane aux ions PO_4^{---}, nous avons le choix entre deux hypothèses :

— ou transport passif par diffusion ;

— ou transport actif, associé au métabolisme énergétique de la cellule.

La première de ces deux hypothèses est plausible, si la concentration extracellulaire est supérieure à la concentration intracellulaire : le gradient de concentration est alors favorable à un processus de diffusion. Les ions PO_4^{---} traversent la membrane, se répartissent dans le compartiment minéral et, secondairement, la glycolyse les incorpore dans les fractions organiques.

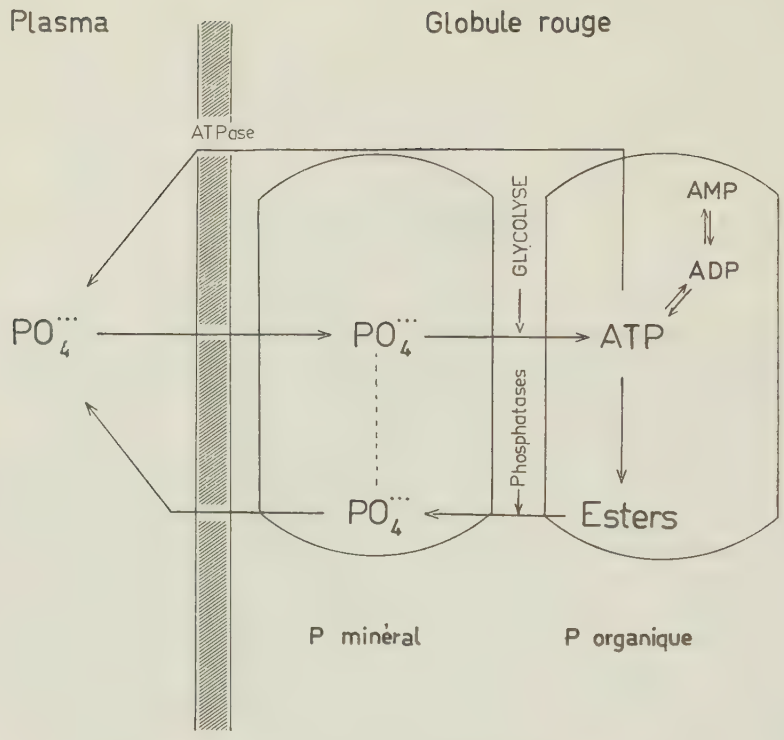


FIG. 1
Les compartiments phosphores de l'érythrocyte humain

Dans la seconde hypothèse, le transport est directement dépendant de la glycolyse : celle-ci fournit à la fois l'énergie et les phosphodérivés organiques qui se forment au cours du passage à travers la membrane de PO_4^{---}.

L'analyse du mécanisme de transport est malaisé car dans les deux hypothèses, la glycolyse se trouve impliquée :

— soit indirectement dans le cas de la diffusion passive ;

— soit directement dans celui du transport actif.

Autrement dit, si nous marquons les ions PO_4^{---} *extracellulaires par du* ^{32}P, *la radio-activité se répartit dans les deux compartiments intracellulaires, quel que soit le mécanisme de la perméabilité. Mais, il est évident que la cinétique de cette incorporation du* $^{32}PO_4^{---}$ *dans les diverses fractions phosphorées intracellulaires sera très différente dans les deux cas.*

Pour élucider le mécanisme de la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions PO_4^{---}, *et choisir entre les deux hypothèses de transport, il nous faut :*

— définir la vitesse de pénétration de l'ion en fonction du temps, de la température, et sa répartition dans les diverses fractions intracellulaires. Par suite de l'intensité de la glycolyse, il est nécessaire de procéder à une étude sur

des temps très courts, à la fois pour saisir la forme sous laquelle pénètre PO_4^{---} et pour suivre sa destinée intracellulaire. Le bilan doit être particulièrement détaillé en ce qui concerne les fractions adényliques (ATP/ADP/AMP), dont on sait le rôle métabolique fondamental et la participation au transport actif des cations :

— éliminer la possibilité de la formation d'un composé phosphoré organique transitoire, au niveau de la membrane, qui jouerait le rôle d'un transporteur de PO_4^{---}. L'entrée de PO_4^{---} correspondrait soit à une diffusion facilitée, soit à un transport actif, selon que la formation de ce composé organique exigerait ou non un apport énergétique.

Pour cela :

— 1° rechercher les caractères d'un transport facilité :

• L'effet de saturation du site transporteur par des concentrations extracellulaires croissantes en PO_4^{---} ;

• L'effet de compétition par des homologues de structure, tels ASO_4^{---} SO_4^{--} .

— 2° étudier l'influence de la glycolyse :

• soit en modifiant le niveau de la glycémie ;

• soit en inhibant la dégradation du glucose ;

• soit enfin en provoquant une déviation et une accélération de la glycolyse par certains colorants rédox, du type bleu de méthylène.

Tel est sommairement esquissé l'objet de ce travail.

Dans un premier chapitre, sous le titre « Structure du globule rouge et mécanismes de la perméabilité ionique », nous étudierons successivement :

— la composition chimique et la structure de la membrane ;

— la composition chimique du milieu intraglobulaire ;

— l'équilibre de répartition des ions.

Après avoir passé en revue les travaux qui s'attachent à la distribution des ions PO_4^{---} dans le milieu extra et intracellulaire, nous rappellerons brièvement les caractères de la glycolyse dans le G.R.

Le second chapitre sera consacré à l'exposé et à la discussion des techniques. Nous y rassemblerons les données analytiques concernant les diverses fractions phosphorées, minérales et organiques, et nous les comparerons à celles qui ont été publiées antérieurement.

Enfin, dans le troisième chapitre, après avoir défini les deux compartiments phosphorés du G.R., nous développerons nos recherches personnelles, dont nous avons exposé ci-dessus les grandes lignes.

Première partie

✳

LA STRUCTURE DU GLOBULE ROUGE ET LES MÉCANISMES DE LA PERMÉABILITÉ IONIQUE

✳

Le choix du globule rouge comme matériel cellulaire pour étudier la perméabilité demande une explication. S'il est évident que le contrôle des concentrations de deux côtés de la membrane est plus aisé avec des cellules isolées, ce sont essentiellement des raisons d'ordre technique et métabolique qui ont motivé ce choix.

— **D'ordre technique :** disponibles en grande quantité, les globules rouges sont des cellules robustes, que l'on peut conserver au froid sans perte appréciable de viabilité, que l'on peut fragmenter en échantillons semblables, séparer du milieu d'expérience et laver par centrifugation. La teneur en hémoglobine, très constante, permet un dosage spectrophotométrique sensible et simple de la quantité de cellules utilisée.

L'hémolyse est un moyen facile de débarrasser les cellules de leur contenu et de préparer des membranes.

La forme du globule rouge, qui réalise la plus grande surface pour le plus faible volume, est très sensible au degré de tonicité du milieu, mais les variations de volume se font sans variations de surface. Lorsque le globule rouge se gonfle, son volume peut tripler en passant de la forme biconcave à la forme sphérique, sans que sa surface en soit sensiblement modifiée. De toute évidence, ces propriétés géométriques du globule rouge sont particulièrement favorables à l'étude des mécanismes de perméabilité.

— **D'ordre métabolique :** plus encore que les précédentes, ce sont les particularités métaboliques du globule rouge qui favorisent l'étude de la perméabilité aux ions PO_4^{---}. Le globule rouge est une cellule en survie, pratiquement dénuée d'activités de synthèse, dépourvue de structures intracytoplasmiques. La respiration est presque nulle, car le cycle tricarboxyliques de KREBS est aboli. Seule subsiste une glycolyse modérée, qui emprunte surtout la voie classique d'EMBDEN-MEYERHOF, accessoirement le shunt des pentoses : ce qui amène à remarquer que la recharge de l'ATP se fait par un mécanisme plus simple (donc plus facile à suivre) que dans les cellules à respiration très active.

En regard de ces multiples avantages, un inconvénient qui risque de compliquer l'interprétation de certains résultats doit être souligné. Le prélèvement de globules est constitué par une population hétérogène, comprenant des cellules d'âges différents : la durée de vie chez l'homme est d'environ 120 jours, le prélèvement comprend donc des cellules de tous les âges qui n'ont pas le même comportement métabolique (Cf. en particulier (142), (153), (16), (28). Toutefois, cette hétérogénéité est statistiquement constante, d'un sang à un autre, à condition que le prélèvement ait été effectué chez un adulte normal.

Ce sont également des considérations pratiques qui nous ont fait choisir le globule rouge *humain :* la proximité d'une « banque de sang », pour des prélèvements importants. Pour des prélèvements plus modestes, les veines du personnel du Laboratoire.

Mais nous devons dès maintenant souligner que les conclusions de ce travail concernent le *globule rouge humain*, et qu'il serait imprudent de les étendre à d'autres espèces, même voisines, sans autres vérifications. Bien que le rôle des hématies soit identique dans toute la série animale, il est évident que l'on ne peut identifier dans une même étude le comportement des globules rouges nucléés d'oiseaux (qui respirent activement), et dont la structure cellulaire est beaucoup plus proche de celle des autres tissus et celui des globules rouges des mammifères, dépourvus de noyau et de mitochondries, pratiquement réduits à une membrane et un cytoplasme.

Même chez les mammifères, les différences entre les espèces sont importantes : elles ne concernent pas seulement la forme et la taille de l'hématie, mais également la structure de la membrane, la composition chimique et les mécanismes de perméabilité.

— **La structure de la membrane** : la composition des lipides du stroma n'est pas la même chez les ruminants et chez les autres mammifères : ces derniers ont une teneur en lécithines et en phosphatidyléthanolamine moins élevée, diminution qui est compensée par une augmentation des fractions sphingolipidiques (59).

Le taux d'acide sialique et la stabilité de ses combinaisons sont également différents : les protéases libèrent des quantités variables d'acide sialique et le comportement des globules rouges de l'homme, des primates, du cheval et du bœuf n'est pas celui des autres mammifères (211), (212).

— **La composition chimique** : les ions sont répartis très inégalement selon les espèces : ces différences sont particulièrement nettes lorsqu'on compare les teneurs en sodium et en potassium.

TABLEAU I

Sodium et potassium des érythrocytes de différentes espèces animales

	En milliéquivalents/litre de G. R.	
	SODIUM	POTASSIUM
Homme	20	140
Singe	20	110
Lapin	16	99
Rat	12	100
Mouton	46	58
Bœuf	79	22
Chien	107	9
Chat	104	6

La concentration et la répartition des composés phosphorés acido-solubles varient considérablement. Les mammifères se répartissent en deux groupes :

— les uns (homme, primates, chien, cheval) ont une teneur élevée, comprise entre 300 et 1.000 milligrammes de P par litre de globules, et, sauf chez le cheval, le 2-3-diphosphoglycérate représente la fraction la plus abondante (chez l'homme : 90 % du P acido-soluble) ;

— les autres (bœuf, mouton chèvre) ont une teneur faible comprise entre 90 et 150 milligrammes de P par litre, et l'ATP représente plus de la moitié de cette fraction ;

— chez le chat, la composition de la fraction acido-soluble se situe entre celles des deux groupes précédents.

Des différences qualitatives importantes traduisent une diversité de comportement métabolique : le 2-3-diphosphoglycérate fait défaut chez le bœuf et la chèvre, et les deux enzymes de la déviation de RAPOPORT-LUEBERING (2-3- DPG - mutase, et 2-3- DPG - phosphatase) sont absents. *

— **les mécanismes de perméabilité :** Selon les espèces, le cation prédominant est le sodium ou le potassium. Ce fait illustre évidemment des mécanismes de perméabilité différents. Ces variations sont encore plus nettes lorsqu'on compare la pénétration du glucose (ou du glycérol ou des polyols) chez les mammifères : les globules rouges de l'homme sont aisément perméables au glucose, ceux du porc, du lapin, du cobaye, du cheval et du mouton ne le sont pas. Complexité accrue ! l'imperméabilité de certaines espèces varie avec l'âge : le glucose pénètre chez le fœtus du cobaye et du mouton.

Ces divergences de composition et de comportement selon les espèces souligne la complexité des mécanismes de perméabilité des globules rouges : en particulier, la pénétration des orthophosphates liée à leur incorporation dans les phosphodérivés de la glycolyse, peut également dépendre de leur incorporation dans les phospholipides ou les phosphoprotéines et il est possible que les mécanismes diffèrent selon les espèces animales.

C'est pourquoi nous avons limité cette étude au globule rouge humain.

---

* De même chez le pigeon, le 2-3-DPG est remplacé par l'acide phytique (195).

CHAPITRE I

COMPOSITION CHIMIQUE ET STRUCTURE DE LA MEMBRANE

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA MEMBRANE

L'ultrastructure de la surface des globules rouges, et celle des membranes isolées à l'état de « ghosts » ou de stroma, associe des protéines et des lipides sous forme de complexes lipoprotéiques, dont certains sont doués de propriétés enzymatiques et auxquels sont liés des sels minéraux.

I. Les protéines de structure :

Chaque globule rouge contient environ $0{,}8.10^{-12}$/g de protéines non hémoglobiniques, ce qui représente environ 3 % des protéines totales.

Une grande confusion règne dans la nomenclature des protéines qui participent à la structure de la membrane de l'hématie, car les fractions isolées ne correspondent pas toujours à des entités chimiquement bien définies. Une des principales difficultés réside dans l'extraction de protéines insolubles en milieu aqueux dans un état aussi proche que possible de leur état naturel. De nombreux auteurs ont abordé le problème par des méthodes qui se proposent de rompre les liaisons avec les fractions lipidiques.

Schéma de CALVIN (35)

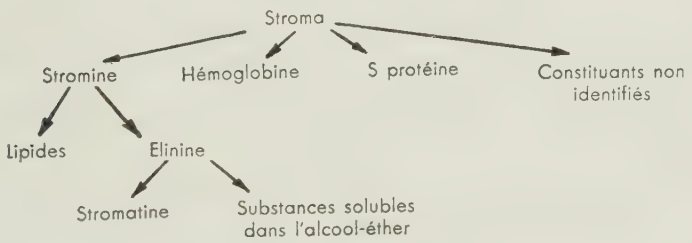


FIG. 2
Fractionnement des protéines de la membrane du globule rouge humain

CALVIN (163) hémolyse les globules avec de l'eau, isole et sèche les stroma et les remet en suspension dans l'eau. Après un contact à pH 7,3 le matériel est centrifugé à grande vitesse et le culot lavé plusieurs fois à pH 9,0. Ce culot, blanc crémeux, est appelé *réticuline* ou *stromine*. La protéine se présente sous la forme de particules de 5 à 11 μ de long et de 0,3 à 1,3 μ d'épaisseur. Cette structure fibrillaire peut donner des gels pour des concentrations supérieures à 5 %. Son poids moléculaire élevé,

de l'ordre de 40.10^6, sa teneur en azote (8 %) et en P (1 %) traduisent son hétérogénéité : des lipides sont extractibles par l'éther et elle renferme une fraction glucidique.

Séchée et extraite par l'éther, la réticuline donne une autre fraction, l'élinine. Son extraction par l'alcool isole une protéine que l'on suppose être identique à la *stromatine* de JORPES et de BOEHM (120), protéine de forme allongée, douée de biréfringence d'écoulement.

Au cours de la préparation de l'élinine, le surnageant précipite à pH 6,4 (en l'absence de sels) ou à pH 5,0 (en présence de sels) : le précipité est constitué par une protéine, la S-Protéine, soluble dans l'eau à pH 9 et insoluble en milieu acide. Elle serait analogue à la fraction B que STERN (221) a séparée par électrophorèse et semble être un mélange de polypeptides, de protéines et de mucoprotéines.

A cette multiplicité de fractions protéiques généralement mal individualisées, conviendrait-il peut-être d'ajouter l'hémoglobine car pour certains elle est considérée comme constituant de la membrane, complexée à des mucoprotéines ou à des lipides (malgré des lavages répétés 3 % environ de l'hémoglobine reste attaché au stroma). Toutefois, ce problème a été récemment discuté par DODGE et ses collaborateurs (65). Par hémolyse hypotonique à pH 7,4 dans des conditions peu traumatisantes, sans perte de lipides ou d'azote non hémoglobinique, ils ont obtenu des « ghosts » complètement débarrassés de leur hémoglobine.

Des fractions décrites par d'autres auteurs peuvent être assimilées aux précédentes : la stromine, encore appelée réticuline, n'est pas une entité homogène. C'est un mélange d'élinine et de lipides. La stromatine correspond sans doute à la partie protéique de l'élinine.

Pour compléter cette formule protéique du stroma, nous devons signaler qu'il existe à la surface externe de la membrane plusieurs protéines que les lavages libèrent aisément :

— une globuline, qui s'élimine dès les premiers stades de la préparation de la réticuline ;

— une albumine pauvre en sucres : le « facteur anti-sphéring » ;

— des lipoprotéines associées au caractère antigénique de l'hématie.

Enfin des travaux récents (130) (131) (132) identifient la présence dans le stroma d'acide neuraminique lié à une mucoprotéine : un acide acétylneuraminique a été isolé. Cet acide sialique serait localisé sur la face externe de la membrane, et sous l'action d'une neuraminidase, la totalité de cette structure anionique est éliminée : la mobilité électrophorétique du globule rouge est alors considérablement diminuée (51) (72) (211).

II. **Les protéines enzymatiques :**

C'est un caractère actuellement bien établi et dont la signification commence à se préciser, que certains systèmes enzymatiques sont associés

à la structure lipoprotéique de la membrane. Toutefois, il demeure souvent difficile d'affirmer qu'un enzyme retrouvé dans le stroma en est un constituant original. Les techniques d'isolement des stroma peuvent en effet entraîner des artefacts, soit qu'un enzyme de la membrane se solubilise au cours des manipulations, soit, au contraire, qu'un enzyme cytoplasmique s'adsorbe au cours de l'hémolyse sur la membrane.

— L'ATPase, ou apyrase a été signalée pour la première fois dans les stroma en 1931 (7). De nombreux travaux ont depuis précisé sa cinétique. Son pH optimum est de 6,8, et elle est activée par les ions Na^+ et K^+. Il semble que cet enzyme soit inactif tant que la structure lipoprotéique de la membrane n'est pas lésée ; mais l'hémolyse (soit par l'eau, soit par congélation et décongélation), la lyophilisation provoquent son activation. Selon CARTA VIVALDI (37), l'ATPase se localiserait sur les deux faces de la membrane, mais resterait distincte du complexe lipoprotéique. Cet enzyme jouerait un rôle important dans le transport actif des ions Na^+ et K^+ à travers la membrane (Cf. plus loin).

— **La 2-3-diphosphoglycérate phosphatase** : autre phosphatase spécifique qui catalyse l'hydrolyse du 2-3-diphosphoglycérate (accumulé dans le cycle de LUEBERING-RAPOPORT) en 3-Phosphoglycérate. Cet enzyme exigerait la présence d'un coenzyme cytoplasmique (48).

— Le stroma serait doué d'activité phosphomonoestérasique : pour TSUBOI (229), il existerait une seule phosphatase (de pH optimum 5,5). Pour CLARKSON, MAIZELS (48), trois phosphatases, activées par Mg^{++} et inhibées par Ca^{++} seraient responsables d'une partie des orthophosphates intracellulaires.

— Selon HOKIN (111) (112), le transport actif de Na^+ et K^+ ferait intervenir un transporteur lipidique, l'acide phosphatidique. Ce mécanisme (« cycle phosphatidique ») mettrait en jeu deux enzymes localisés au niveau de la membrane :

une diglycéride kinase, qui transforme un diglycéride en acide phosphatidique en présence d'ATP ;

une phosphatidate phosphatase, qui hydrolyse l'acide phosphatidique en diglycéride et PO_4^{---}.

Ces deux enzymes n'ont pas été isolés des stroma, mais leur présence a été démontrée par leur action *in vitro*.

Une nicotinamide-adénine dinucléotidase, ou DPNase (2) (3), inhibée par la nicotinamide serait localisée sur la face externe du globule rouge, une altération de la membrane en libérant la DPNase, entraînerait une destruction du DPN, et secondairement une diminution de la glycolyse : ce mécanisme interviendrait au cours de la conservation du sang *in vitro*. Une TPNase a également été signalée (128) (36).

— La **cholinestérase** est difficilement séparable du stroma. On a invoqué son intervention dans le transport actif des cations : mais il ne

semble pas que les très faibles concentrations en acétylcholine de l'hématie soient suffisantes pour rendre compte du couplage énergétique indispensable au transport contre un gradient de concentration (156). D'ailleurs, les « ghosts » sont encore capables de transport actif après inactivation par l'ésérine de la cholinestérase (80) (242), et le transport du K^+ n'est pas changé dans les érythrocytes déficients en cholinestérase (6).

— **L'anhydrase carbonique**, qui catalyse l'hydratation réversible du CO^2, joue un rôle primordial dans les échanges respiratoires : plusieurs formes ont été séparées par chromatographie ou par électrophorèse.

Il semble que ce soit le seul métalloenzyme du globule rouge.

— Trois protéases ont été signalées dans le stroma (161) :

l'une de pH optimum 7,4 est activée par les agents réducteurs, par les ions Zn^{++} et Fe^{++} ;
une autre de pH optimum 7,2 ;
la troisième de pH optimum 3,2.

Leur participation au métabolisme du globule rouge n'est pas précisée.

— Si les enzymes précédents semblent localisés uniquement dans la membrane, on retrouve dans le stroma de faibles activités d'enzymes représentés dans le cytoplasme : en particulier, 10 % de l'activité nucléoside phosphorylasique et 8 % de l'activité adénosine désaminasique subsistent dans le stroma. Ces enzymes existant également dans le plasma, leur origine et leur signification demeurent imprécises.

III. **Les lipides :**

La solubilité d'une substance dans les lipides constitue un des facteurs déterminants de la perméabilité. Selon certaines théories la substance qui pénètre dans la cellule doit se dissoudre et s'incorporer dans une couche périphérique de nature lipidique avant de diffuser à l'intérieur de la cellule.

Les caractères immunologiques, associés au déterminisme des groupes sanguins et aux phénomènes d'hémoagglutination, traduisent une participation de complexes lipidiques localisés à la surface de la cellule et doués de propriétés antigéniques.

L'analyse du mécanisme de l'hémolyse relie les altérations de la surface, qui provoquent la diffusion dans le milieu extérieur du contenu cellulaire, aux modifications de structure de la membrane par des agents capables de s'adsorber sur les lipides, ou de se combiner chimiquement avec eux, ou de les solubiliser.

Ainsi l'étude des mécanismes de la perméabilité, de l'hémoagglutination et de l'hémolyse permet de conclure que la surface externe de l'hématie doit présenter une structure très particulière, où les lipides occupent une place importante. La composition des lipides du globule rouge

est actuellement à peu près établie, bien que de nombreuses divergences existent. Les raisons en sont multiples :

1. D'abord certaines fractions lipidiques qui semblent localisées à la surface la plus externe de la cellule sont particulièrement labiles : selon LOVELOCK (145), de simples lavages avec des solutions salines extraient des lipides. Mais REED (201) conteste cette observation.

2. L'influence de l'anticoagulant n'a pas fait l'objet d'études systématiques. Toutefois, il semble que certains d'entre eux, qui possèdent un caractère anionique marqué, telle l'héparine, provoquent des modifications de la structure lipidique de la surface (hydrolyse partielle des céphalines) (101).

3. Les analyses concernent indifféremment les globules entiers ou les stroma : les résultats sont comparables à condition d'admettre un double postulat :

a) la totalité des lipides est liée à la structure périphérique du globule rouge.

Selon la majorité des auteurs, 90 % à 100 % des lipides sont retrouvés dans le stroma, mais CORSINI n'y retrouve que les deux tiers environ (52) ;

b) la technique d'hémolyse, qui conduit à l'obtention de « ghost » ou de stroma n'entraîne pas de solubilisation de lipides.

ERICKSON (70) montre que dans des conditions douces, l'hémolyse s'accompagne d'une perte d'environ 10 %, et des conditions plus défavorables entraînent des pertes plus considérables encore (jusqu'à 60 %) (240). Toutefois, DODGE (65) a obtenu des stroma entièrement débarrassés de leur hémoglobine avec une teneur normale en lipides, bien qu'ils eussent perdu des protéines. Ces divergences soulignent la difficulté du problème.

4. Les techniques analytiques sont également une cause importante de discordances. Il est certain que les techniques modernes de séparation, par chromatographie à contre-courant, conduisent à une finesse analytique plus grande que les méthodes chimiques d'isolement.

Les travaux les plus récents tiennent compte de la grande labilité de certaines fractions, sensibles à l'hydrolyse spontanée ou à l'auto-oxydation : en particulier, l'existence de lysodérivés est discutée et nombreux sont les auteurs qui les considèrent comme des artefacts.

La répartition des divers types de lipides :

La plupart des lipides isolés avec le stroma sont liés à des protéines sous forme de complexes lipido-protéiques. Le rapport Lipides/Protides varie peu. Il est compris, suivant les espèces, entre 0,55 et 0,63. La stabilité de la liaison avec les protéines est très variables. PARPART et BALLENTINE (181) ont classé les constituants lipidiques selon la facilité de leur extraction par les solvants organiques :

— lipides faiblement liés : 14 % (céphalines = 25 %) ;

— lipides moyennement liés : 44 % (cholestérol = 100 %), (céphalines = 25 %) ;

— lipides fortement liés : 42 % (céphalines = 50 %), (lécithines = 100 %), (sphingolipides = 100 %).

Nous devons retenir la fragilité des liaisons du cholestérol et de certaines céphalines avec les protéines, la résistance élevée des lipoprotéines à lécithines et à sphingolipides, caractères qui correspondent à des localisations différentes dans l'ultrastructure de la membrane.

Cet ensemble de travaux permet de dégager quelques points importants.

1. La faible teneur en lipides du type glycérides. En raison de leur caractère non polaire, ils ne semblent pas s'incorporer facilement dans les structures lipidoprotéiques.

2. La teneur relativement élevée en cholestérol, que l'on a cru d'abord en grande partie estérifié, comme dans le plasma. Mais, d'après les travaux récents, il existerait presque exclusivement sous forme libre, facilement échangeable avec le cholestérol du milieu plasmatique.

Les tableaux suivants résument les résultats les plus récents :

TABLEAU II

Comparaison de la répartition lipidique dans les globules rouges et les « Ghosts »
(exprimée en pourcentage du P lipidique total)
(selon DAWSON) (59)

	Ghosts	Cellules entières
— Lecithines	30,3	36,4
— Céphalines :		
phosphatidyl Et. amine	15,2	17,6
phosphatidylsérine	13,0	5,1
— Sphingomyéline	19,3	16,2
— Plasmalogène :		
à choline	2,3	5,7
à sérine	0,8	0,3
à Et. amine	6,0	5,6
— Monophosphoinositides	1,4	0
— Acides phosphatidiques	1,7	1,2
— Polyglycérol Ph° Lipides	0	0
— Inconnu	3,0	2,6

TABLEAU III

Répartition des lipides des globules rouges
(selon FARQUHAR) (73)

	En mg pour 1 000 ml hématies	Chromatographie ac. silicique	
		El. éther (=non PhºL)	El. méthanol (= PhºL)
Poids lipides totaux.....	5 100 ± 510		3 440
Phosphore.....	119 ± 8	—	117
Phospholipides	2 980 ± 200	—	2 940
Plasmalogène	560	—	550
Cholestérol total.....	1 200 ± 87	1 180	—
Acides gras	2 000	60	1 900
Divers.....	920 ± 180	150	510
— Glycéro Phº Et. amine	29% des phospholipides tot.	= 864 mg/1000 ml	
— Glycéro Phº Sérine ...	10%	— = 298	—
— Glycéro Phº Choline ..	36%	— =1073	—
— Sphingolipides	21%	— = 626	—

TABLEAU IV

Répartition des diverses fractions lipidiques du globule rouge
(exprimée en pourcentage des lipides totaux)

Références	(67)	(60)	(246)	(201)
Glycérides	9	6	—	3
Cholestérol	25	23	30	23
Phospholipides	55	53	58	65
Glycolipides	12(249)	—	9	10

TABLEAU V

Pourcentage des diverses fractions phospholipidiques du globule rouge

Références	(46)	(102)	(183)	(201)	(133)	(73)
— Phospholipides à choline :						
— Lécithines.....	32,9	35	35	30	30	36
— Lysocithines.....	1,9	—	2	2,5	2,4	—
— Sphingomyélines	22,8	28	25	22	26	21
— Céphalines	42,5	37	35			
— à sérine				14,9	13,8	10
— à Et. amine				24,6	24,1	29
— Phosphoinositides	—	—	4	4	3,8	—
Polyglycérol Phº Lipides	—	—	—	2	0	—
— Acides phosphatidiques	—	—	3	—	—	—

3. L'importance des fractions phospholipidiques soulignée par leur abondance : la teneur du globule rouge est supérieure à celle du plasma, et la proportion en est différente. Leur fractionnement est délicat, car certains de leurs constituants sont instables et se modifient facilement. La présence de lysodérivés est très controversée.

Plusieurs auteurs en signalent de faibles quantités. Les lysocéphalines selon KATES (124) seraient un chaînon normal de la biosynthèse des céphalines. Le blocage du système enzymatique responsable de la conversion (lysophosphatidyléthanolamine... phosphatidyléthanolamine) serait responsable de la forme sphérique des hématies de sujets atteints de sphérocytose héréditaire. L'altération des céphalines de la membrane entraînerait les modifications du transport et du métabolisme constatées.

Il est toutefois difficile de préciser dans quelle mesure on doit considérer ces lysodérivés comme des artefacts : FARQUHAR (73), qui opère avec de grandes précautions pour éviter l'auto-oxydation et l'hydrolyse spontanée, n'en retrouve pas. Signalons une observation de HANAHAN WATTS, PAPPAJOHN : le sang prélevé sur héparine provoque la transformation des phosphatidyléthanolamines en lysodérivés (101).

4. La proportion relativement élevée (10-15 %) de phosphatidylsérine qui, dans le plasma représente seulement 4,9 % du P total lipidique (24), et celle relativement très élevée d'acétal-phosphatides « plasmalogène » dans la fraction céphaline. Selon FARQUHAR (73), 67 pour cent des glycérophosphatidylethanolamines seraient sous forme acétal — ou énoléther —, proportion exceptionnelle dans les tissus : elle ne se retrouve que dans la myéline, et pourrait constituer un caractère distinctif des lipoprotéines des membranes. Selon DE GIER (60), la labilité des fractions à phosphoéthanolamine extraites des stroma correspondrait aux acétal-phosphatides de ce groupe.

5. La teneur en acides phosphatidiques est faible : peu d'auteurs signalent leur présence, et pourtant, selon HOKIN et HOKIN (112), ces dérivés constituent la plaque tournante du transport actif du sodium et du potassium au niveau de la membrane cellulaire.

6. A cette structure lipidique de la membrane participent également en faible quantité des glycolipides. KLENK et RENNKAML (129) dès 1942 avaient signalé la présence de céramide oligosaccharides. Plus récemment YAMAKAWA et SUZUKI (248) ont isolé des globules rouges un glycolipide dénommé « globoside », constitué d'acide lignocérique, de sphingosine, d'acétylgalactosamine et de trois molécules de galactose. Des gangliosides semblables à ceux du cerveau ont aussi été caractérisés par BOOTH (26). Ces glycolipides seraient associés aux activités A B O des groupes sanguins.

La répartition des acides gras :

L'analyse des acides gras a bénéficié de l'application de la chromatographie en phase gazeuse. Le tableau suivant, emprunté à DOUSTE-BLAZY (67), rassemble, simplifiés, les résultats de divers auteurs :

Récemment, FARQUHAR (73) a réalisé une étude très complète de la répartition des acides gras dans les diverses fractions phospholipidiques.

TABLEAU VI

Répartition des acides gras des globules rouges humains

— acide palmitique	19,8 à 25,0 %
— acide stéarique	13,5 à 18,0 %
— C_{16} monoéthyléniques	0,65 à 1,47 %
— C_{18} monoéthyléniques	19,0 à 21,6 %
— C_{18} diéthyléniques	10,3 à 14,6 %
— C_{19} monoéthyléniques	10,5 à 15,2 %
— C_{20} polyéthyléniques	2,1 à 4,8 %

TABLEAU VII

Pourcentage de répartition des acides gras dans les fractions phospholipidiques
selon FARQUHAR (73)

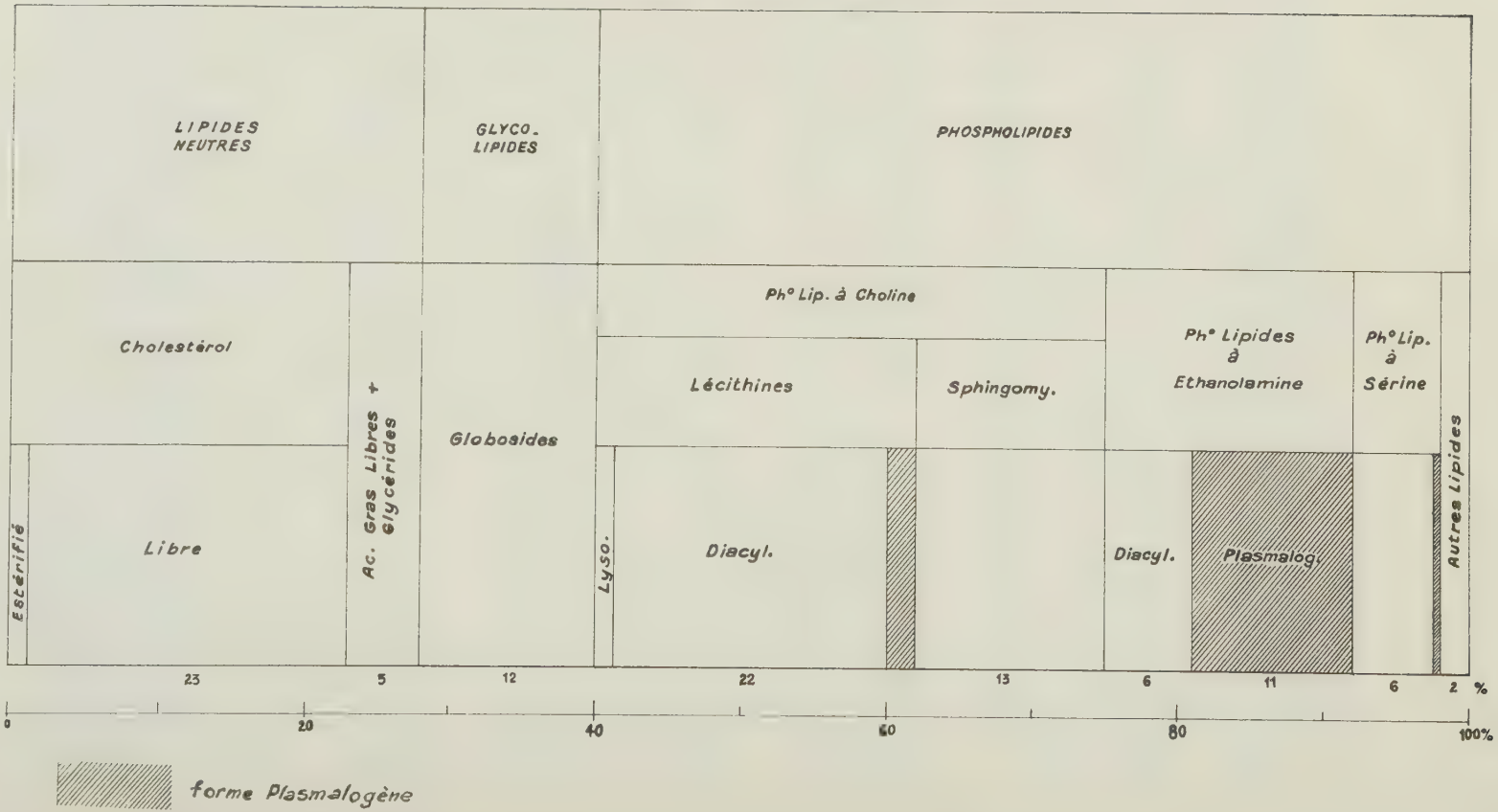
	Ac. gras saturés	Aldéhydes gras	Ac. gras non saturés
Ph° Glycérides :			
— à éthanolamine	18,5	31,5	50,0
— à sérine	47,1	3,8	49,1
— à choline	46,1	4,2	50,2

Les phospholipides renferment 50 % d'acides gras non saturés, localisés en position β la position α étant occupée, soit par un acide gras (sous forme ester), soit par un aldéhyde gras (sous forme d'énol-éther).

La fig. 3 illustre la distribution moyenne des différentes classes de lipides dans l'érythrocyte.

FIG. 3

Distribution des différents lipides du globule rouge humain



IV. Les cations.

Nous savons peu de chose sur la répartition et le rôle des cations dans la membrane. Le Mg^{++} et le Ca^{++} peuvent être considérés comme liés à la structure des lipoprotéines, le premier très vraisemblablement associé à certains enzymes. Cette liaison, qui résiste aux lavages par des solutions salines, est modifiée par des solutions isotoniques de non-électrolytes (lactose, par ex.), d'où une brusque augmentation de la perméabilité aux cations. L'addition de Ca^{++} restaure d'une manière spécifique la perméabilité ; le fluorure ou le citrate l'empêchent. Cette action du Ca^{++} apparaît également dans les expériences de GARDOS : (81) l'inhibition de la glycolyse provoque une sortie de K^+, stoppée en présence d'EDTA et qui reprend si on ajoute à nouveau du Ca^{++}. De même, l'absence de Ca^{++} dans le milieu externe (ou la formation de complexe avec EDTA) empêche l'accumulation intracellulaire de K^+, sans influencer le métabolisme énergétique.

Le mécanisme d'action du calcium sur la perméabilité est mal connu. Il est possible, comme on l'a démontré dans le rein, qu'il modifie le rayon des pores (il est augmenté en son absence) (244). L'élimination par des agents complexants, tel le citrate ou l'EDTA, altérerait soit la polarité de surface des pores (SOLOMON) (218), soit la stabilité des sels de phospholipides ou d'un complexe Ca-ATP-Protéine (1). Retenons enfin une suggestion de JUDAH (121) : en plus d'un effet stabilisateur (diminuant la perméabilité à forte concentration et l'augmentant aux concentrations basses), l'ion Ca^{++} aurait une action sur le métabolisme antagoniste de celle du $Na.^{++}$ SKOU (215) (216) a signalé que l'activation de l'ATPase par Na^{++} ou K^{++} est réversée par les ions Ca^{++}.

LA STRUCTURE DE LA MEMBRANE

En montrant que les lipides et les protéines représentent les deux constituants majeurs du stroma, l'analyse chimique a établi une notion fondamentale : la structure de base de la membrane est constituée par un complexe lipidoprotéique. Mais la chimie est rapidement apparue insuffisante pour expliquer la disposition à l'échelle moléculaire. Les nombreuses théories qui ont été proposées pour fournir de cette ultrastructure une image qui soit en accord avec les mécanismes de perméabilité s'appuient également sur des données physiques et morphologiques. Il semble inutile de développer toutes les théories proposées ; elles ne diffèrent généralement que par des détails de structure, variantes cherchant à intégrer le plus grand nombre possible de faits d'expériences ; nous retiendrons seulement les principales constatations fournies par des méthodes physiques ou chimiques :

— les molécules localisées en surface du globule rouge présentent un degré d'orientation élevé, qui contraste avec l'absence d'orientation du contenu cellulaire. Toutefois, cette couche structurée de surface se prolonge vers l'intérieur, le degré d'orientation s'atténuant progressivement, et il

est impossible de détacher une couche superficielle bien définie. D'ailleurs, la concentration de l'hémoglobine est telle qu'elle se trouve dans le globule dans un état intermédiaire entre une solution vraie et un état paracristallin ;

— l'épaisseur de la membrane n'est pas connue avec précision. Les valeurs publiées s'échelonnent entre 25 Å et 800 Å, et MITCHISON (159) l'estime même à 5 000 Å ; GLYNN (85) a souligné ces divergences considérables, que ne suffit pas à expliquer la grande variété de méthodes utilisées. La plupart des mesures sont faites sur des membranes desséchées : il est donc nécessaire de connaître le degré d'hydratation pour corriger cette valeur, et son estimation varie, suivant les auteurs, de 25 à 67 % (240) (187) ;

— les études en lumière polarisée indiquent que les lipides et les protéines ont une orientation différente : la couche lipidique, disposée en surface, aurait une disposition radiale ; la couche protéique sous-jacente, une orientation tangentielle ;

— la présence de charges négatives à la surface de l'hématie, responsable des propriétés électrophorétiques, est également compatible avec la présence d'un film externe de phospholipides, bien que des travaux récents l'attribuent aux carboxyles des molécules d'acide sialique localisé à la surface de la cellule (51) (72) ;

— le degré de liaison des lipides avec les protéines varie considérablement, comme nous l'avons précédemment souligné. La fraction stérolique, très labile et métaboliquement échangeable avec celle du plasma, milite également en faveur d'une localisation en surface ;

— les données fournies par la microscopie électronique sont assez décevantes. Les ghosts traités par l'acide phosphotungstique présentent une surface discontinue constituée de plaques de 20 Å d'épaisseur, sur 200 Å de diamètre, de fibres de 20 Å d'épaisseur sur 200 Å de long. Les plaques se détachent sans se dissoudre par action de l'éther, ce qui est en faveur de leur nature protéique. Cette discontinuité de la surface est également attestée par des données chimiques : FEHER (74) a montré, en étudiant les groupements terminaux de la surface de l'hématie, que des chaînes d'arginine émergent, et certainement liées aux protéines sous-jacentes. Cette structure en mosaïque rendrait évidemment compte des mécanismes de perméabilité des substances hydrophiles et liposolubles.

Les interprétations de ces données expérimentales sont multiples : rien ne saurait mieux illustrer l'incertitude persistante sur l'ultrastructure de la membrane du globule rouge que la reproduction des quatre schémas les plus classiquement commentés :

La figure 4 rend compte du caractère ionique de la membrane. Le cholestérol stabilise la couche de phospholipides qui est étroitement liée à la couche sous-jacente de stromatine liée elle-même à la couche plus interne d'hémoglobine. Ce schéma matérialise également la notion de pores ou

Schéma de WINKLER (1940) (247)

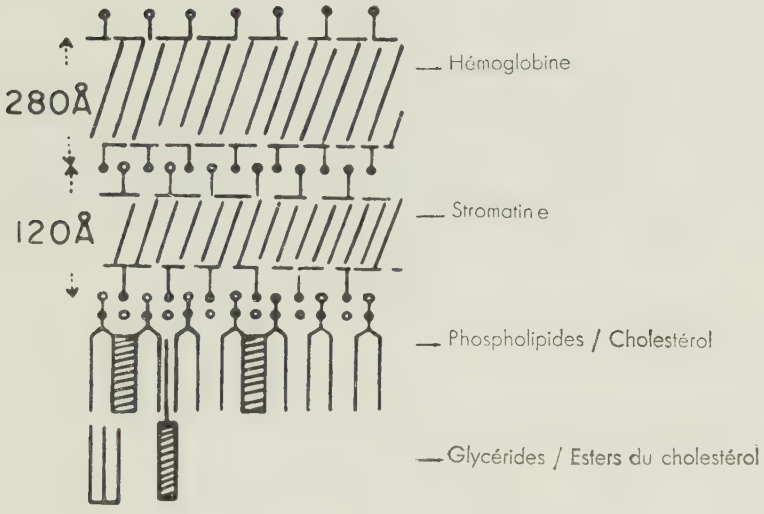


FIG. 4

Organisation moléculaire des constituants de la membrane selon le schéma de WINKLER (1940)

Schéma de PONDER (1951) (187)

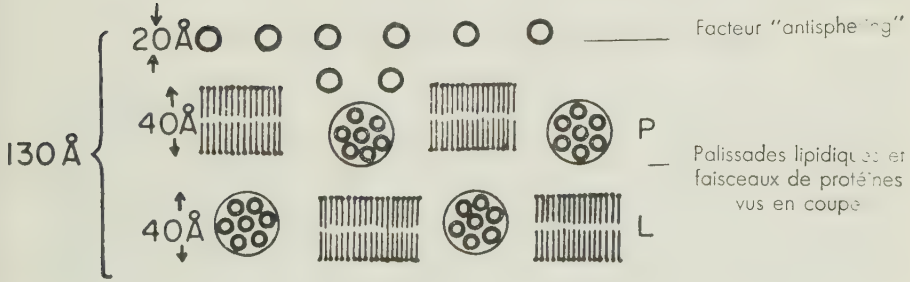


FIG. 5

Organisation moléculaire des constituants de la membrane selon le schéma de PONDER (1951)

de canaux hydrophiles : ces pores, dont SOLOMON et Coll. (176) (86) ont mesuré le rayon (3,5 à 4,2 Å) — mais le microscope électronique n'a pas encore pu en matérialiser l'image — expliquent la diffusion des anions. Ils correspondraient aux zones où le cholestérol est absent et où la couche lipidique se trouve interrompue. Ce rôle stabilisateur du cholestérol serait analogue à celui qui a été démontré pour la myéline du nerf.

Selon PONDER (187), les lipides ne forment pas une couche régulière mais une série de micelles qui se concentrent près de la surface. La stromatine est disposée en faisceaux entre les palissades lipidiques, et la structure de la surface se présente comme une mosaïque de lipides et de protéines. Dans ce schéma, PONDER figure la couche superficielle d'une albumine, le facteur anti-sphéring, que de simples lavages peuvent aisément détacher.

Schéma de MITCHISON (1953) (159)

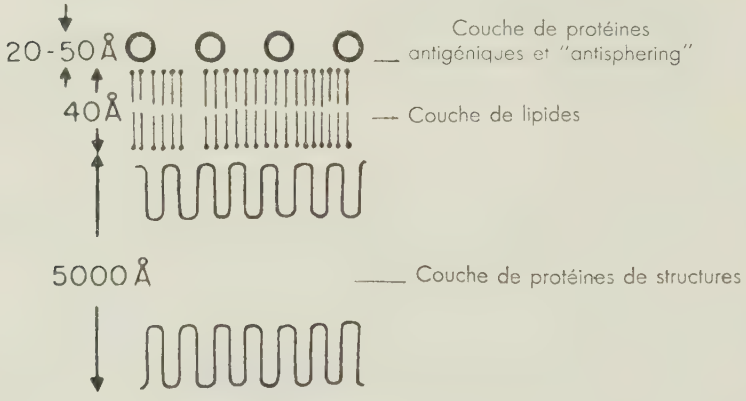


FIG. 6
Organisation moléculaire des constituants de la membrane
selon le schéma de **MITCHISON** (1953)

MITCHISON localise la couche de lipoprotéines, d'une épaisseur de 40 Å à la surface, tapissée à sa face externe par une couche labile des facteurs antigéniques et anti-sphéring. Cette couche lipidique de perméabilité recouvre une épaisse couche (5 000 Å) d'un gel protéique de faible concentration (teneur en eau de 96 %). Dans cette couche, fortement structurée (comme le montre la biréfringence), les chaînes polypeptidiques seraient repliées en feuillets disposés radialement.

Une représentation plus concrète dans sa simplicité a été proposée par DANIELLI (57). La microscopie électronique et les travaux les plus récents qui tendent à généraliser la notion d'unité de membrane à d'autres systèmes intracellulaires (mitochondries, réticulum endothélial) lui ont donné un regain d'actualité.

La membrane externe de la cellule serait constituée par une double couche lipidoprotéique de 120 à 160 Å d'épaisseur.

La figure 7 traduit cette conception de DANIELLI.

Schéma de DANIELLI (1954)

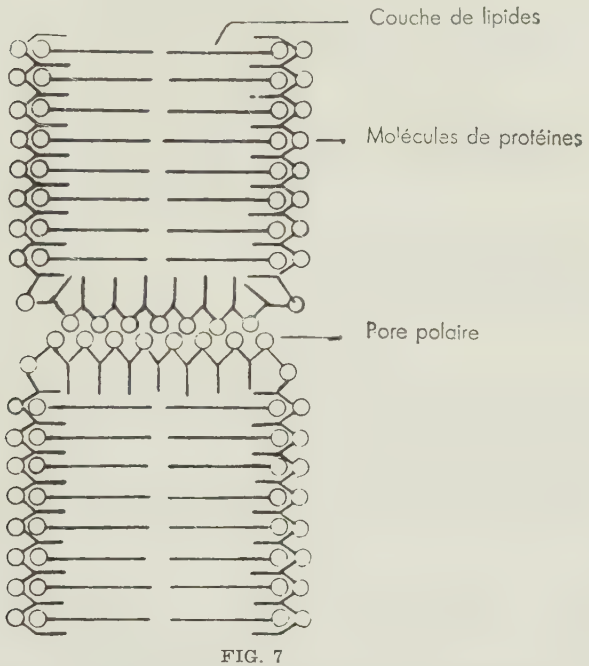


FIG. 7

Organisation moléculaire des constituants de la membrane selon le schéma de DANIELLI (1954)

Ces divers schémas ne représentent que des tentatives d'explication de l'ultrastructure de la membrane. Il semble qu'on ait tiré des études physiques le maximum de renseignements. Actuellement, les recherches s'orientent à nouveau vers la biochimie fine des couches lipoprotéiques.

La couche protéique est responsable d'une certaine rigidité de la cellule entière. L'entrée de l'eau en milieu hypotonique ne produit l'hémolyse que lorsqu'on dépasse un certain volume critique : (160% du volume initial), correspondant à celui d'une sphère de surface sensiblement équivalente à celle de la cellule initiale biconcave. Cette forme biconcave est liée au caractère contractile de la protéine : la cellule rendue sphérique en milieu hypotonique récupère sa forme discoïdale lorsque la tonicité initiale est restaurée. NAKAO (167) (168) qui a étudié cette contractilité, montre qu'elle nécessite la présence d'ATP : elle est donc dépendante de la glycolyse.

Dans une série de travaux récents d'une très grande portée, GREEN (94) souligne l'aspect biochimique d'une notion qui s'est déjà fait jour au cours de ces dernières années dans les travaux de microscopie électronique de BAYER (15) ROBERTSON (203) DOUGHERTY (66) KAVANAU (125).

Tous les systèmes de membranes présentent une unité de structure, qu'il s'agisse de membranes externes de la cellule, de mitochondries, de microsomes ou de chloroplastes. A cette analogie de structure correspondent des propriétés physiologiques communes : toutes

— constituent une barrière de perméabilité ;

— sont capables de transport actif des ions contre un gradient de concentration ;

— sont douées de propriétés contractiles et d'activité ATPasique.

Les analogies sont frappantes :

— elles ont toutes en commun une structure trilaminaire dont l'épaisseur ne varie pas de $\pm$ 30 Å, selon les types de membrane étudiés ;

— la mésocouche est constituée de protéines de structure (insolubles dans l'eau à pH neutre, mais que l'on peut solubiliser par dépolymérisation par de nombreux réactifs) et de phospholipides à caractère micellaire, riches en acides gras polyéthyléniques ;

— sur cette mésocouche vient se greffer une structure particulaire (extrêmement nette dans le cas des mitochondries) qui renferme des systèmes actifs.

Illustrant cette notion d'unité de structure et de fonction, RICHARDSON a isolé du globule rouge, avec un rendement élevé, des protéines proches de la protéine de structure de la mitochondrie et qui se combinent avec les micelles phospholipidiques pour former un complexe hydrophobe. Par ailleurs, HULTIN a également isolé du globule rouge une particule, initialement liée au stroma, douée d'activités enzymatiques associées à la recharge de l'ATP (lactico- et triosephosphate-deshydrogénase, Triosephosphate isomérase, ATPase) et qui contient 30 % de lipides. Enfin, OHNISHI (172) (173) a mis en évidence dans le stroma une protéine contractile, douée comme la myosine d'activité ATPasique.

Ces travaux sont encore trop récents et fragmentaires pour qu'il soit possible d'en dégager une image plus précise de l'ultrastructure de la membrane. Mais il est certain qu'ils représentent une orientation nouvelle dans l'interprétation des mécanismes de la perméabilité qu'ils soient cellulaires ou particulaires.

CHAPITRE II

COMPOSITION CHIMIQUE DU MILIEU INTRAGLOBULAIRE

Les principales caractéristiques du milieu intraglobulaire sont suffisamment connues : nous rappellerons dans la figure 8 la répartition des anions et des cations, comparée à celle du milieu extracellulaire plasmatique. Nous attirerons l'attention sur les points suivants.

1. Le potassium est considéré comme le cation caractéristique du milieu intracellulaire : c'est exact chez l'homme (ainsi que le rat, le lapin, le cheval) où le globule rouge comme les autres cellules a une concentration élevée en K^+ et faible en Na^+ (rapport K^+/Na^+ compris entre 5 et 10). Au contraire, chez de nombreux mammifères (chien, chat, mouton, porc), le potassium du globule rouge est en concentration très basse (bien qu'il prédomine dans les autres cellules). Par exemple chez le chat ou le chien, le rapport K^+/Na^+ se situe aux environs de 0,06.

2. L'hémoglobine représente 90 % du poids sec de l'érythrocyte et 97 % de ses protéines. Sa participation au bilan anionique intracellulaire à une telle concentration (33 g pour 100 ml de globules) entraîne une incertitude dans l'évaluation de ce bilan*. Il est, en effet, difficile de définir le caractère anionique de l'hémoglobine, qui varie notablement selon qu'elle fixe ou non de l'oxygène : HbO_2 est un acide plus fort que Hb, sa dissociation négative est donc plus élevée. Pour les mêmes raisons, les concentrations intraglobulaires en Cl^- et CO_3H^- dépendent également de l'équilibre Hb/HbO_2.

3. Les concentrations plus élevées de Cl^- et CO_3H^- dans le plasma s'expliquent par la présence dans le milieu intracellulaire d'anions non diffusibles (hémoglobine, esters phosphoriques) qui imposent les conditions d'un équilibre de GIBBS-DONNAN. C'est également ce phénomène qui est responsable du bilan ionique plus élevé dans le milieu intracellulaire.

4. La distribution passive des anions à travers la membrane est confirmée par l'accord des potentiels électrochimiques mesurés à l'intérieur de la cellule (— 5 à — 10 mV) et calculés en fonction d'une distribution passive (— 9,9 mV).

Dans le tableau VIII, nous avons figuré des limites de variations des cations majeurs du globule rouge humain, et indiqué également la concentration des oligoéléments cationiques qui y ont été décelés. Ces valeurs sont comparées à celles du plasma.

---

* Que traduit d'ailleurs en partie dans le schéma le compartiment désigné par « Indéterminé ».

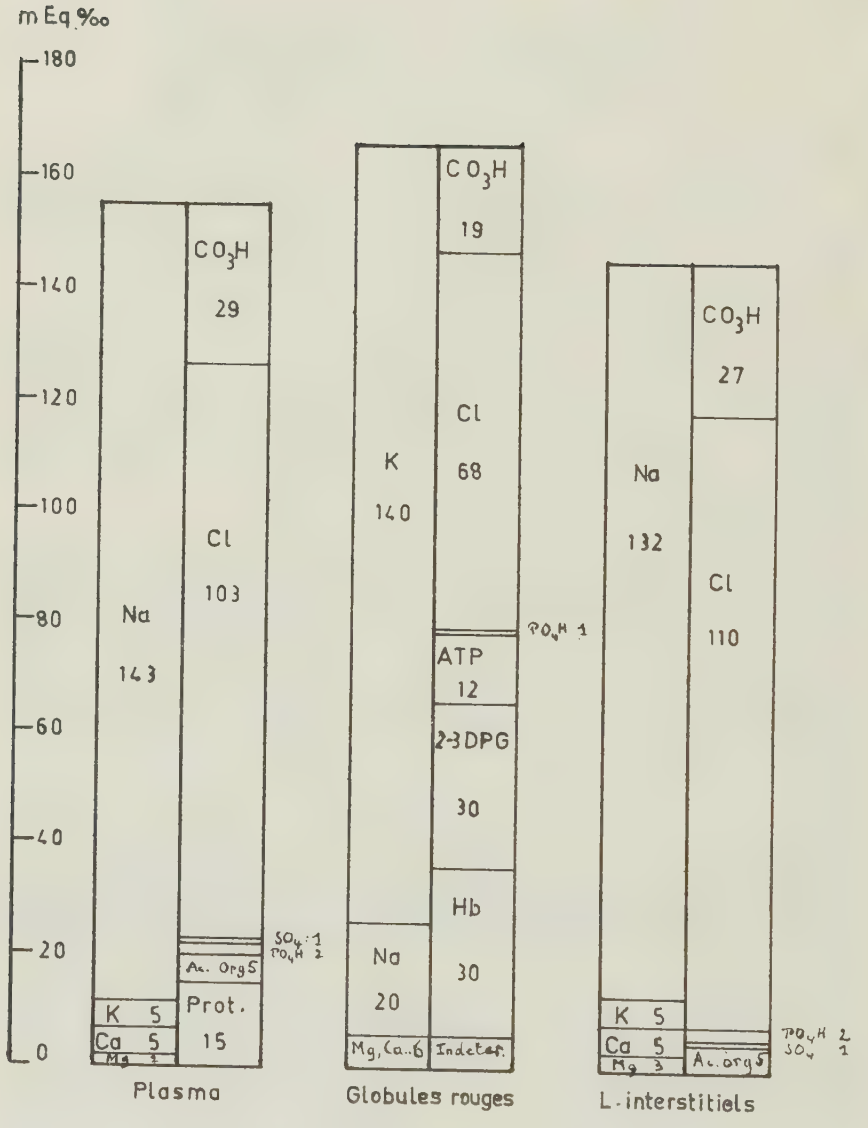


FIG. 8

Composition acido-basique des globules rouges humains

TABLEAU VIII

Les cations du globule rouge humain
(valeurs comparées à celles du plasma)

	Globules rouges			Plasma	
	Mg/L eau de cel.	mEq/L	Réf.	Mg/L	mEq/L
K	5 300-5 900	135-150		160-220	4,1-5,6
Na	320-460	14-20		3 200-3 540	140-154
Mg	62,15	5,18	231	19,6	1,6
	64,80	5,40	177		
Ca	19,80	0,99	236	100	5
	4,0	0,20	25		
	2,64	0,13	231		
Zn	11,4	(0,35	177	2,70	0,08
	11,6	0,36)	231		
Cu	0,94	0,03	177	0,99	0,03
	1,01		231		
Mn	0,08	0,003	126		
Ni	0,051	0,002	177	0,023	0,008
Pb	0,24	0,002	126		
Sn	0,11	0,002	126		
Cr	0,022	(0,0008)	177	0,024	0,0009
Si	traces				

CHAPITRE III

ÉQUILIBRE DE RÉPARTITION DES IONS

I. — LES MÉCANISMES GÉNÉRAUX DE LA PERMÉABILITÉ

Quelle que soit l'image que l'on se fasse de sa structure, la membrane constitue une barrière capable de laisser pénétrer à l'intérieur de la cellule, par des mécanismes très variés, des particules dont le diamètre va de celui de l'ion hydrogène à celui de particules microscopiques.

Si, dans le cas du globule rouge, cette pénétration par mouvements amiboïdes ou par pinocytose est exclue, la membrane se révèle perméable aux ions minéraux et à des molécules de taille relativement faible (dont le poids moléculaire peut atteindre 200).

Certains de ces échanges avec le milieu extérieur s'effectuent avec une extrême rapidité. Ainsi, les mouvements de l'eau : à une perturbation osmotique, la cellule répond par un appel ou un départ d'eau.

Mais, secondairement, donc plus lentement, la constance de composition du milieu intracellulaire et le retour au volume initial sont assurés par un transport plus complexe de molécules ou d'ions à travers la membrane.

La force motrice d'un tel transport est fournie :

— soit par l'énergie cinétique propre des corps dissous : transport par diffusion ;

— soit par l'énergie métabolique de la cellule : transport actif.

Dans le second cas, les énergies mises en jeu sont évidemment bien plus considérables ; alors que la diffusion ne peut s'établir que dans le sens du gradient électrochimique de concentration, le transport actif est capable de réaliser un mouvement de molécules ou d'ions à contre-courant de ce gradient. C'est ce caractère qui distingue le mieux les deux types de transport.

Sans entrer dans les détails des multiples théories de la perméabilité cellulaire, nous emprunterons à PARK (180) une classification qui nous paraît le mieux résumer les différents types de mécanismes mis en œuvre par la cellule pour faire pénétrer les substances dissoutes du milieu extracellulaire.

1°) **La simple diffusion** : la substance passe à travers les pores aqueux de la membrane. Sous l'effet de l'agitation thermique des molécules, la substance diffuse selon le gradient de concentration jusqu'à ce qu'elle atteigne un équilibre libre. Dans la plupart des cas, les mouvements de l'eau correspondent à une diffusion simple.

D'autres variantes ont été proposées dans un but de classification logique.

— DIFFUSION avec COURANT de SOLVANT : le mouvement de la substance à travers les pores est facilité par un courant osmotique (perméabilité de la thiourée).

— DIFFUSION RESTREINTE par la CHARGE de MEMBRANE : selon ce mécanisme, de petits ions, tel Cl^- passent à travers les pores de la membrane, chargés positivement : la perméabilité des anions est facilitée par ces charges, alors que celle des cations est empêchée.

— DIFFUSION RESTREINTE par une BARRIERE LIPIDIQUE : dans ce cas, la substance pénètre dans la cellule en fonction de ses caractères de liposolubilité. Elle se dissout dans la couche lipidique de la membrane, puis secondairement dans la phase aqueuse intracellulaire. Ce mécanisme, qui ne met pas en jeu les pores, est confirmé par la corrélation entre le coefficient de répartition eau/lipides et la vitesse de pénétration de nombreuses *substances non électrolytes.*

Aucun des mécanismes précédents ne doit normalement provoquer d'accumulation à contre-courant d'un gradient de concentration. Aucun ne nécessite de couplage énergétique. Il faut toutefois souligner qu'une concentration apparente de la molécule transportée est possible, si cette molécule contracte une liaison avec un site intracellulaire, ou si elle s'incorpore dans des combinaisons organiques.

2°) **Le transport actif** : selon les biophysiciens, ce terme a un sens bien précis basé sur des considérations énergétiques. Lorsqu'il s'agit d'ions, il est restreint au transfert qui s'établit contre un gradient de potentiel électrochimique.

La difficulté que l'on rencontre pour définir expérimentalement la différence de potentiel entre les deux faces de la membrane fait que la vérification physico-chimique de cette définition est rarement possible.

Aussi, une définition biochimique — sans doute moins rationnelle — s'est progressivement substituée qui s'appuie :

— d'une part sur la détermination des concentrations extra et intracellulaire de l'ion,

— d'autre part sur l'interférence du métabolisme énergétique de la cellule avec la perméabilité et qui considère qu'il y a « transport actif » lorsque l'ion pénètre contre un gradient de concentration et que cette perméabilité exige un couplage énergétique.

La molécule se combine avec un transporteur. Le complexe (S, Tr) subit au niveau de la membrane des modifications chimiques. La molécule à transporter passe sur l'autre face de la membrane à l'état de complexe, est libérée, et pénètre dans la cellule.

Parmi les nombreux exemples de ce type de transport actif, citons celui de Na^+ et K^+ dans les cellules des mammifères, l'absorption et la sécrétion de nombreuses substances par les tubes rénaux, et (d'une manière plus limitée) par l'épithélium intestinal.

Par le couplage énergétique mis en jeu, cet important processus permet à la cellule d'accumuler des métabolites qui se trouvent dans le milieu ambiant à une forte dilution, favorise l'excrétion de substances de déchet et contribue efficacement au maintien d'un volume cellulaire normal.

3° **Le transport facilité :** un type intermédiaire de transport a été proposé sur des données également biochimiques qui est une variante du « transport actif » défini ci-dessus mais dans lequel le couplage énergétique n'apparaît pas nécessaire. Ce mode de transport auquel on a donné le nom de « diffusion facilitée » fait intervenir une combinaison avec un site transporteur de la membrane, combinaison qui se dissocie sur la face interne en libérant le composé transporté. On admet que la combinaison (Substrat/Transporteur) qui évoque la combinaison (Substrat/Enzyme) de la catalyse enzymatique, se fait sans emprunt énergétique. Elle est donc indépendante d'un couplage avec la glycolyse, mais sa cinétique répond aux mêmes lois que celle de l'activation enzymatique, en particulier on peut le caractériser par :

1° Un effet de saturation du transporteur : la vitesse de diffusion n'est plus une fonction linéaire du gradient de concentration : aux concentrations extracellulaires élevées, la courbe de vitesse s'infléchit, traduisant un effet de saturation du transporteur (analogue à celui qui régit en enzymologie la combinaison enzyme/substrat).

2° Un effet de compétition : des substances présentant une analogie étroite de structure avec la substance étudiée diminuent la perméabilité : ce phénomène correspond à une compétition des deux substances pour le site actif et s'apparente étroitement dans sa cinétique à l'inhibition compétitive en enzymologie.

3° Une inhibition par certains effecteurs qui, en se combinant avec le site actif, ralentissent la pénétration.

Ce type de transport règle en particulier la pénétration des oses dans la cellule.

Sans entrer dans les discussions qui opposent biophysiciens et biochimistes quant aux mécanismes intimes de la perméabilité et à leur classification, nous trouvons commode d'adopter dans un travail biochimique la conception peut-être simplifiée que nous venons de résumer et nous discuterons le mécanisme du transport des ions PO_4^{---} en envisageant :

soit une diffusion simple,

soit une « diffusion facilitée »,

soit un « transport actif ».

II — LA PERMÉABILITÉ AUX IONS PO_4^{---}

Les théories du transport des ions PO_4^{---} dans le globule rouge

Le nombre de travaux tendant à établir le mécanisme de la perméabilité de la membrane du globule rouge aux ions PO_4^{---} est considérable. A de rares exceptions près, les expériences anciennes où le dosage chimique constituait le seul test pour suivre la pénétration dans la cellule ne peuvent être retenues : c'est le marquage isotopique par $^{32}PO_4^{---}$ qui permet actuellement de mesurer l'intensité et la vitesse de l'équilibre intra- et extracellulaire.

La vitesse de pénétration des ions PO_4^{---} dans le globule rouge est relativement faible, si on la compare à celle des ions Cl^- ou CO_3H^- (99). Elle est comparable à celle des ions SO_4^{--} (202) (185). Exprimée en temps de 1/2 renouvellement, elle est pour :

— Cl^- ..... de 0,2 seconde (228)

— CO_3H^- (échange Cl^-, COH_3^-) ..... de 0,14 seconde (147)

— SO_4^{--} (échange Cl^-, SO_4^{--})..... de 80 minutes (227)

1. Les travaux anciens :

Déjà dans les expériences les plus anciennes apparaît un désaccord sur les théories proposées. Pour les uns, l'entrée est réglée par une diffusion passive selon le gradient de concentration (HAHN et HEVESY (99) sur le lapin, DUNKER et PASSOW (68bis) sur le cheval, MUELLER et HASTINGS (164) sur l'homme.

Selon d'autres, tels HALPERN (100), EISENMAN (69) des concentrations différentes des deux côtés de la membrane sont maintenues pour justifier un transport actif ; les auteurs insistent sur les différences de cinétique en fonction de la température.

Certaines de ces expériences doivent être accueillies avec beaucoup de réserve. Le plus souvent, la pénétration a été suivie par le dosage chimique des ions PO_4^{---} après des incubations de longue durée (plusieurs heures). L'interprétation est d'autant plus douteuse que la séparation des deux compartiments intracellulaires n'a pu être réalisée. Enfin, elles concernent des sangs d'espèces différentes dont l'identité de comportement reste à démontrer.

2. Les travaux modernes :

Les travaux plus récents appliquent les techniques actuelles plus rigoureuses de séparation des diverses fractions organiques et mesurent l'incorporation en marquant les ions PO_4^{---} extracellulaire par du ^{32}P.

Parmi ces travaux, les plus nombreux concluent à une *entrée active* des ions PO_4^{---} dans le globule. Trois arguments surtout appuient cette conclusion :

1. Il est impossible de mettre en évidence à l'équilibre une relation de DONNAN, c'est-à-dire une répartition du type :

$$\frac{PO_4H_2^-\ (I)}{PO_4H_2^-\ (E)} = \frac{Cl^-(I)}{Cl^-(E)} = \frac{CO_3H^-\ (I)}{CO_3H^-\ (E)} = 0{,}6 \text{ à } 0{,}7$$

2. L'influence de la température sur la vitesse de pénétration traduirait une participation métabolique : l'entrée de PO_4^{---} est très faible ou nulle aux températures inférieures à 15°C ; elle s'élève avec la température. L'énergie d'activation, qui traduit cette influence est élevée 16 900 (87), 19800 calories (188). Ces valeurs semblent à certains plus compatibles avec un transport actif s'accélérant en même temps que l'activité de la cellule, qu'avec un transport passif par diffusion, pour lequel l'énergie d'activation serait de l'ordre de 4 à 5 000 calories.

3. Si l'on détermine l'activité spécifique des diverses fractions phosphorées intracellulaires, avant que soit atteint l'équilibre de répartition du ^{32}P, l'incorporation par diffusion devrait faire apparaître la plus forte activité dans les orthophosphates, or, cette opinion contredit les résultats obtenus par de nombreux auteurs (90) (188) (82) (224) ; ceux-ci considèrent en effet qu'un dérivé associé à la glycolyse fixe d'abord PO_4^- extra-cellulaire, que l'isotope se répartit ensuite dans les divers intermédiaires de la glycolyse, et que son apparition dans les orthophosphates est le résultat d'une hydrolyse secondaire de certains de ces phosphodérivés.

L'opinion la plus généralement admise pour rendre compte de ce transport actif fait intervenir un couplage avec la glycolyse.

1. En l'absence de glucose, la glycolyse est ralentie, mais l'entrée des ions PO_4^{---} l'est également (92) (188) (88).

2. Le blocage de la glycolyse par des inhibiteurs (monoiodacétate, fluorure) ralentit la pénétration des ions PO_4^{---} dans le globule (188) (88) (83) (138).

La nature du premier composé qui fixe $^{32}PO_4^{---}$ varie :

— pour FRANKERD (188), c'est le 2-3 DPG qui est le plus fortement marqué ;

— pour la plupart des auteurs, c'est l'ATP qui est le premier intermédiaire décelable. Il proviendrait soit de la recharge de l'ADP dans la réaction d'oxydation phosphorylante du triosephosphate (90) (82) (10) (138) (224), soit, comme l'a suggéré GOURLEY (89) (117) d'une phosphorylation directe de l'ADP (par un mécanisme qu'il ne précise pas) au niveau de la membrane cellulaire.

D'autres hypothèses ont été formulées qui n'associent pas le transport actif à la glycolyse. BARTLETT a évoqué, sans plus, la possibilité d'une phosphorylation directe du glycogène par une phosphorylase, donnant naissance à du glucose-6-phosphate (10). RUMMEL (208) souligne que le pH optimum de l'α-Glycérophosphatase correspond au pH optimum d'entrée des ions PO_4^{---} : il en conclut que la perméabilité est réglée par l'hydrolyse phosphatasique ; LAITY (138) fait dépendre l'entrée de PO_4^{---} d'une réaction de phosphorylation oxydative (analogue à celle qui met en jeu la chaîne cytochromique des autres cellules) : il constate que le dinitrophénol, agent découplant la phosphorylation oxydative, a une action inhibitrice sur le transport. KAHN (122) suggère, sans préciser, l'intervention de deux voies métaboliques différentes comme générateurs d'énergie, et GERLACH (83) imagine une voie de phosphorylation sans participation de l'ATP.

Certaines de ces conceptions paraissent fort discutables ; en particulier, l'absence de chaîne respiratoire dans le globule rouge souligne le caractère audacieux de l'interprétation de LAITY. Quelles aient été sérieusement proposées montre que l'explication d'un transport actif couplé avec la glycolyse n'est pas entièrement satisfaisante. Et certains auteurs (88) (91) admettent que l'entrée des ions phosphates est réglée par un double mécanisme de transport actif et de diffusion passive.

Il peut sembler paradoxal que la théorie de la diffusion simple des ions PO_4^{---} n'ait pas rencontré plus de défenseurs ; à priori, deux faits indiscutables militent en sa faveur :

— La nature anionique de PO_4, dont la pénétration est favorisée par l'existence de charges positives au niveau de la membrane : or, ce mécanisme de diffusion est admis sans discussion pour les autres anions (Cl^-, CO_3H^-, SO_4^{--}, I^-, etc.).

— Le gradient de concentration favorable au passage du milieu extracellulaire (où la concentration est la plus élevée) vers le globule (où la concentration est plus faible).

De nombreuses objections peuvent être formulées contre la théorie d'un transport actif, et bien des arguments sur lesquels elle s'appuie, sont discutables ou de valeur douteuse.

— L'équilibre de DONNAN est difficile à démontrer aux concentrations en PO_4^{---} (E) physiologiques, mais VESTERGAARD BOGIND (233) a établi qu'une surcharge extracellulaire en PO_4^{---} se répartit de la même façon que les ions Cl^-. La cinétique se rapproche de celle d'une simple diffusion lorsque les concentrations en orthophosphates sont élevées, autrement dit, lorsque le compartiment organique intracellulaire ne représente plus 98 % du P total ;

— Les arguments tirés d'une énergie d'activation élevée ne sont pas plus convaincants : ce caractère ne peut être considéré comme preuve irréfutable d'un transport actif, et nous en discuterons plus loin la signification.

— La comparaison des activités spécifiques fournit certainement les indications les plus précieuses. Mais en premier lieu, il faut souligner la difficulté technique de la séparation et de l'analyse des phosphodérivés ; en outre, l'interprétation de certains résultats est discutable. Si la pénétration des ions PO_4^{---} est un phénomène relativement rapide, leur incorporation dans les intermédiaires de la glycolyse l'est également. La comparaison des activités spécifiques n'a de sens qu'en dehors de la phase d'équilibre, qui s'établit rapidement entre PO_4 (E), PO_4 (I) et Porg. (I). Pratiquement, les expériences où la durée d'incubation excède trente minutes ne peuvent être interprétées. C'est seulement pendant des temps inférieurs à quelques minutes que la répartition du ^{32}P extracellulaire à l'intérieur du globule permet de suivre la forme de transport du phosphore à travers la membrane.

L'aspect énergétique du transport actif met au premier plan le couplage avec une réaction catabolique ou un ensemble de réactions plus ou moins complexes. Dans le cas du globule rouge, c'est l'association avec la glycolyse qui a été le plus souvent invoquée. Le globule rouge dégrade le glucose par deux voies différentes : la voie habituelle d'EMBDEN-MEYERHOF et le shunt des hexoses monophosphates. La participation respective des deux voies, dans les conditions normales, nous est connue : pour au moins 90 %, la glycolyse se fait par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF.

Dans de nombreuses expériences, le rôle de la glycolyse est loin de paraître évident. Nous aurons l'occasion de discuter cette notion en interprétant nos résultats. Soulignons seulement ici certaines des divergences les plus flagrantes :

— La vitesse d'entrée (ou de sortie) des ions PO_4^{---} est maximum à pH 6,4-6,6, alors que le pH optimum de la glycolyse se situe aux environs de 8,0 (208).

— La cinétique du transport de PO_4^{---} est identique, que la glycolyse soit normale ou déviée vers le shunt par la présence de monoiodacétate et d'adénosine. ZIPURSKY (253) en conclut que le facteur limitant l'entrée de PO_4^{---} est indépendant de l'intensité de la glycolyse et de ses modalités.

— Enfin, l'action des inhibiteurs conduit à des résultats souvent contradictoires ; le fluorure freine la glycolyse : le ralentissement de l'entrée de PO_4^{---} signalée par GOURLEY (88) n'est pas retrouvé par d'autres chercheurs (4) (138). Le cyanure, qui est sans action selon les uns (165), ralentit l'entrée selon d'autres (99).

III. — LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DU GLOBULE ROUGE

Comme nous l'avons déjà souligné, la participation des orthophosphates aux réactions de la glycolyse, sous forme d'intermédiaires phosphorylés, complique l'interprétation des mécanismes de perméabilité.

Dans la cellule, les orthophosphates participent à un cycle de réactions dont il est nécessaire de préciser les termes : nous ne retiendrons ici que les grandes lignes du métabolisme glucidique du globule rouge, en insistant sur les points qui le distinguent de la glycolyse des autres tissus.*

L'énergie nécessaire au globule rouge circulant, dérive essentiellement du métabolisme du glucose. Le mannose, fructose, galactose, sont également oxydés, mais les pentoses et les diholosides ne le sont pas. Chez l'homme, les globules rouges utilisent environ 1,4 à 2,2 µM de glucose/millilitre de cellule/heure.

La dégradation du glucose ou glycolyse, conduit à l'acide lactique par un processus essentiellement anaérobie : le quotient glycolytique

$$\frac{\text{mM acide lactique produit}}{2 \times \text{mM glucose dégradé}}$$

est voisin de I (8) (9) (29)

La faible consommation d'oxygène de l'érythrocyte en aérobiose (105) (237) (106) (115) correspond à une quantité d'oxygène (M/l d'oxygène consommé/heure/milligramme de poids de tissu sec) de 0,02 (186) (115), soit le 1/10 des globules rouges nucléés d'oiseaux, moins de 1/1000 des autres cellules de l'organisme. Si le globule rouge est d'abord une cellule nucléée à respiration active, au cours de sa maturation la disparition du noyau et des inclusions mitochondriales entraîne la perte de certains enzymes du cycle de Krebs et de la chaîne transporteur d'électrons (perte progressive car une respiration voisine de celle des érythrocytes nucléés d'oiseaux persiste dans les réticulocytes). On retrouve dans les globules rouges matures des traces de cytochrome c (68) et un certain nombre d'enzymes du cycle de Krebs : isocitrodeshydrogénase (143) (109) (110) — succinodeshydrogénase (115) — malicodeshydrogénase (115) (191). [Des 2 formes distinctes, l'une liée au noyau, l'autre au cytoplasme, seule, la forme cytoplasmatique persisterait (213)] — aconitase (19) — fumarase (190) (207) (50) et peut être oxaloacétate décarboxylase (170). Mais ces enzymes ont une très faible activité. Le pyruvate ne peut être oxydé (56) ni utilisé (143) (241) bien que d'autres voies aient été suggérées (150) (245) (220). On ne peut déceler que des traces des intermédiaires du cycle et ils ne se renouvellent pas (56) : le cycle tricarboxylique de KREBS n'apparaît donc pas dans le globule rouge.

La voie d'EMBDEN-MEYERHOF :

Les intermédiaires de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF ont été isolés, les enzymes identifiés, et leur activité a été mesurée (tableau IX

---

* Les enzymes de la glycolyse du globule rouge ont fait l'objet de plusieurs mises au point du laboratoire auxquelles nous nous permettons de renvoyer (39) (40).

TABLEAU IX

Enzymes de la glycolyse Embden-Meyerhof des globules rouges humains

N° de la réaction	Enzymes	Activité (µM/mlcel/h)	pH	Temp.	Coenzymes	Ref.
1	Ph° Glucomutase	30	7,5	37°	1,6GDP	169
2	Hexokinase	23	7,5	25°	ATP	95
		16	8,1			44
3	Ph° Hexoisomérase	473	7,5	25°		95
		990	7,5	37°		31
		151	8,1			44
4	Ph° Fructokinase	107	7,5	25°	ATP	95
		82	8,1			44
5	Aldolase	39	7,4	37°		30
		60	7,5	25°		143
		31	8,1			44
6	Triosephosphate isomérase	5 170	7,5	25°		143
		5 100	8,1			44
7	ph° Glycéraldéhyde déshydrogénase	241	7,5	25°	DPN	141
		1 190	7,5	25°		95
		800	8,1			44
		108				144
8	Ph° Glycérate kinase	1 580	7,5	25°	ADP	144
		1 738	7,5	25°		95
		1 910	8,1			44
9	Ph° Glycérate mutase	386	7,5	25°	2,3DPG	95
		228	8,1			44
10	Enolase	720	6,8	37°		27
		103	7,5	25°		144
		95	8,1			44
11	Ph° Enolpyruvate kinase	780	7,4	37°	ADP	219
		179	7,5	25°		144
		158	8,1			44
12	Lactico-déshydrogénase	800	7,4	22°	DPN	22
		932	7,5	25°		144
		1 257	8,1			44

et fig. 9). Le caractère original de cette voie glycolytique dans l'érythrocyte réside dans la concentration particulièrement élevée de deux intermédiaires qui n'existent dans les autres cellules qu'à l'état de traces : le 2-3 diphosphoglycérate et le 1-6 diphosphoglucose. Ces deux phosphodérivés interviennent dans les autres cellules comme coenzymes de deux réactions phosphomutasiques : le 1-6 diphosphoglucose, dans la transformation du glucose-1-phosphate en glucose - 6 - phosphate et le 2-3 diphosphoglycérate dans la transformation du phospho-3 - glycérate en phospho - 2 - glycérate.

I. **Le 2-3-diphosphoglycérate** : dans le globule rouge humain, il représente plus de 90 % de la fraction esters phosphoriques et environ 70 % du phosphore acido-soluble. Cette concentration élevée lui assure un rôle important dans le maintien de l'équilibre acido-basique et représente une réserve énergétique qui lui assure un rôle analogue à celui du glycogène : le sang conservé, par exemple, le transforme en pyruvate (22) (179) (242). On l'a parfois considéré comme un produit du vieillissement de la cellule sans rôle métabolique (210) (152), mais un certain nombre d'arguments montrent qu'il prend une part active à la glycolyse : le glucose ^{14}C est rapidement incorporé dans le 2-3-DPG (9) et l'étude de l'incorporation du $^{32}PO_4$ montre que son turnover n'est pas négligeable (98) (99) (89). Le blocage de l'énolase par le fluorure provoque l'accumulation de 2-3 DPG.

RAPOPORT et LUEBERING (196) (197) (198) (199) ont mis en évidence un double système enzymatique : l'un qui catalyse d'une manière irréversible la mutation du P de la position 1 à la position 2 :

1-3-DPG ... ——————————▶ 2-3 -DPG (Phº Mutase)

l'autre hydrolyse le 2-3-DPG en acide phospho-3-glycérique

2-3-DPG ... ——————————▶ 3-PG + PO_4 (phosphatase)

L'ensemble de ces 2 systèmes place le 2-3-DPG sur une dérivation de la voie principale (voie de Rapoport-Luebering) qui contribue à la régulation primaire du métabolisme énergétique du globule rouge (5) (96).

En réalité, le rôle de 2-3-DPG ne nous apparaît que très partiellement : il semble que ce dérivé occupe dans le métabolisme du globule rouge une position plus complexe. DISCHE (64) avait suggéré l'existence d'une forme combinée du 2-3-DPG ; récemment, HASHIMOTO et ses collaborateurs ont montré qu'il existe dans le globule rouge une combinaison de 2-3-DPG avec l'AMP : l'adénylate 2-3-DPG. Son rôle métabolique reste à préciser (107) (108).

II. **Le glucose -1-6- diphosphate** : sa présence a été signalée pour la première fois par BARTLETT (11) qui souligne sa concentration relativement élevée dans le globule rouge humain. Cette accumulation semble peu en rapport avec son rôle de coenzyme de la phosphohexo-mutase, qui d'ailleurs, supposerait une importante glycogénolyse. Or, jusqu'à présent, la voie glycogénolytique n'a pas encore été mise en évidence dans

le globule rouge ; certes, il possède certains enzymes associés au métabolisme du glycogène (phosphorylase, amylo - 1,6 - glucosidase), Phº Glucomutase (134) (169) mais :

— d'une part, l'existence d'un glycogène intraglobulaire n'a pas encore reçu de démonstration, bien que BARTLETT et ALTMAN en aient posé l'hypothèse et que OCKERMAN l'ait signalé dans une séparation sur cellulose modifiée d'une manière assez peu convaincante (171)*.

— d'autre part, le glucose - 1 - phosphate n'a jamais été décelé dans le globule.

La voie des HEXOSES MONOPHOSPHATES :

TABLEAU X

Enzymes du Shunt des hexoses monophosphates dans le globule rouge humain

Nº de la réaction	Enzymes	Activité (µM/mlcel/h)	pH	Temp.	Coenzymes	Réf.
1	G-6-P déshydrogénase	43,1	7,5	23-25°	TPN	153
		74	—	—		44
		72				144
2	6phº gluconate déshydrogénase	60	—	—	TPN	153
3	Phº. cetopentose épimérase	39				144
		- - - -				
4	Phº. ribose isomérase	3 200-5 800				32
5	Trans-cétolase	2,8-7,8			TPP	33
		2,9-12,8				210
6	Transaldolase	- - - -				
7	Aldolase	39	7,4	25°		30
		60	7,5	25°		143
		31	8,1			44

L'incubation d'érythrocytes en présence de glucose ^{14}C donne naissance à du $^{14}CO_2$; nous savons actuellement que ce CO_2 ne provient pas d'une contamination par des leucocytes ou des réticulocytes, comme on l'avait initialement pensé (9) (29) ; il dérive d'une décarboxylation provoquée par un shunt des pentoses phosphates et 8 à 10 % du glucose consommé emprunte cette voie oxydative directe (140) (166) (Schéma 10).

* Malgré cette incertitude, certains cliniciens dosent du glycogène globulaire et décrivent même au cours de certaines glycogènoses des formes de glycogènes anormales !

Les enzymes du shunt existent dans le globule et leur activité a été mesurée (tableau X). Les intermédiaires ont été révélés par chromatographie, bien que certains d'entre eux n'existent qu'à l'état de traces (250) (32) (11).

Les deux premières réactions du shunt exigent comme coenzyme le TPN, qui se réduit au cours des deux réactions d'oxydation du glucose - 6 - phosphate et du phospho-6-gluconate. En l'absence de chaîne transporteuse d'électrons et de réactions de synthèse, la réoxydation du TPNH n'est assurée que par le couplage avec deux réactions :

1. MHb (Fe^{+++}) + TPNH ⟶ Hb (Fe^{++}) + TPN^{+} (127) (114)
2. GSSG + TPNH ⟶ 2GSH + TPN^{+} (193).

La première n'est qu'une réaction d'appoint, la méthémoglobine réductase active semblant plutôt liée au DPNH.

Une partie du GSSG de la réaction (2) pourrait provenir de la réduction directe de la méthémoglobine par le GSH selon une réaction non enzymatique ; 1/3 de la réduction de la méthémoglobine serait ainsi lié au shunt (222). Ces deux systèmes physiologiques ne permettent qu'une très faible réoxydation du TPNH : c'est donc à ce niveau que le shunt se trouve paralysé. Effectivement, l'addition dans le milieu d'incubation de bleu de méthylène ou de certains extraits d'organes, qui interviennent comme accepteurs d'électrons pour le coenzyme réduit, augmente considérablement la respiration et l'oxydation directe du glucose (241) (106) (157) (238) (29).

Le faible fonctionnement de la partie oxydative du shunt, limité sans doute à la demande métabolique de TPNH, ne permet guère — par manque de ribosephosphates — le fonctionnement de sa partie non oxydative. Son activité virtuelle est mise en évidence dans des conditions exceptionnelles qui fournissent à la cellule des pentoses-phosphates, facteur limitant de cette séquence de réaction. Les études sur le métabolisme des purines-nucléosides ont montré que les riboses-phosphates engendrés par action de purine nucléoside phosphorylase étaient effectivement métabolisés, en donnant hexoses et trioses phosphates par les réactions transcétolasiques et transaldolasiques (63) (146) (113). Réaction particulièrement intéressante dans le cas de globules conservés, puisque la phosphorylation de l'ose se fait sans dépense d'ATP et conduit à sa recharge (78) (188).

Dans les conditions physiologiques normales, le shunt hexose monophosphate fonctionne donc en « sourdine » et la voie d'EMBDEN-MEYERHOF est toujours largement prépondérante ; tout au plus, l'importance relative du shunt peut-elle varier : elle est moins sensible que la voie d'EMBDEN-MEYERHOF aux variations de pH (166). et l'oxygène qui freine l'EMBDEN-MEYERHOF, l'augmente peut-être par besoin accru de TPNH dans ces conditions défavorables au maintien du potentiel de réduction.

Les deux voies ont une signification métabolique différente :

— celle d'EMBDEN-MEYERHOF a une signification énergétique. C'est pour l'érythrocyte le seul moyen de produire l'ATP, puisqu'il n'y a ni phosphorylation oxydative, ni synthèse possible « de novo ». Cet ATP est nécessaire au transport actif du sodium et potassium ainsi qu'au maintien de la forme biconcave (167).

— celle des pentoses phosphates est le moyen pour l'érythrocyte de produire le TPNH. Le potentiel réducteur de celui-ci est nécessaire pour protéger, non seulement l'hémoglobine, mais aussi, d'autres protéines d'une dégradation oxydative. Par le maintien à l'état réduit du glutathion, certains enzymes à groupement SH (hexokinase par exemple), sont protégés de l'inactivation que GSSG peut entraîner (209) ; l'action sur les -SH de certaines protéines de structure aurait ainsi un effet stabilisant sur l'intégrité de l'hématie. La facile hémolyse de globules rouges de sujets déficients en glucose -6- phosphodeshydrogénase, et la destruction de globules rouges âgés à activité de glucose -6- phosphodeshydrogénase réduite, s'expliqueraient peut-être par un ralentissement de cet effet protecteur (18) (97) (223).

Contrôle de la glycolyse.

La sensibilité de la glycolyse aux conditions de pH et de température est discutée ailleurs. Dans les conditions physiologiques normales pH7,4 37°C, sa constance témoigne de l'existence de mécanismes régulateurs.

C'est au niveau de la chaîne enzymatique, non des substrats, qu'il convient de les chercher, car la quantité de glucose dont dispose la cellule est toujours supérieure à sa capacité de dégradation (170) et le PO_4 intracellulaire n'est pas non plus facteur limitant.

Dans une chaîne de réactions, la vitesse de l'ensemble est limitée par la réaction la plus lente. HK, PFK, aldolase sont les enzymes les moins actifs (tableau X). Telle qu'elle est déterminée *in vitro*, l'activité des enzymes est une activité potentielle, leur mesure n'a qu'une valeur indicative. Il est pourtant vraisemblable que le contrôle dépend d'une de ces réactions, puisque seuls les substrats intermédiaires décelables appartiennent à la partie de la chaîne d'EMBDEN-MEYERHOF, qui précède l'oxydation des trioses-phosphates.

La différence entre l'activité potentielle et l'activité réelle des enzymes placés dans leur contexte cellulaire dépend de l'intervention d'autres facteurs, en particulier, de la concentration des coenzymes et des réactions de contrôle dites « de régulation en retour ».

I. Concentration des coenzymes.

ADP coenzyme de la PGK, PEPK, dont la régénération ralentie impose la dérivation de RAPOPORT-LUEBERING est le coenzyme limitant la voie principale d'EMBDEN-MEYERHOF.

ATP est normalement en concentration suffisante pour assurer le fonctionnement de HK, PFK. Par contre, sa disparition au cours de la

conservation du sang entraîne l'inactivation de l'HK, et serait selon BISHOP (21) responsable de la diminution de la glycolyse dans du sang conservé, l'activité de l'enzyme n'étant pas touchée.

TPN : c'est le manque de TPN — et non pas des différences d'activités enzymatiques — qui oriente l'oxydation du glucose par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF plutôt que par le shunt.

DPN : le couplage d'oxydo-réduction avec la déshydrogénase lactique n'en fait pas un facteur limitant dans les conditions normales. Le ralentissement de la glycolyse au niveau de l'oxydation Ph° glyceraldehyde conduit à la dégradation du 2-3 DPG jusqu'à l'acide pyruvique par manque de DPNH.

*II. Réactions de « régulation en retour ».**

L'accumulation d'un produit intermédiaire conduit finalement à une inhibition spécifique de la réaction qui lui donne naissance. Les acides mono et diphosphoglycériques jouent ce rôle dans le contrôle du cycle de RAPOPORT et LUEBERING.

Le G-6-P freine l'action de l'HK (54) (205). Puisque le G-6-P est la forme activée du substrat, cette première réaction a une grosse importance dans le contrôle global.

— Pour beaucoup de chercheurs, c'est elle qui règle la vitesse de l'ensemble (200) (210) (44). Il est difficile d'en avoir la preuve, car la diminution du G-6-P par addition de bleu de méthylène lève cette inhibition (21), non au profit de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF, mais du shunt. L'inhibition est levée aussi par l'augmentation de la concentration de PO_4^{---} (206).

L'activité de PFK peut être aussi le facteur limitant de la glycolyse. D'une manière générale, il y a plus d'acide lactique formé à partir du 1,6 FDP, qu'à partir du glucose (139). La baisse du pouvoir glycolytique du sang au cours de sa conservation a été imputée à sa diminution (23).

Selon ROSE, WARMS, O'CONNEL (205), le ralentissement de la glycolyse entraîné par de fortes concentrations d'O_2, résulte vraisemblablement de l'inhibition de PFK (car le point sensible sur la voie d'EMBDEN-MEYERHOF est situé au-dessous de la dérivation du shunt qui, lui, est au contraire exalté par l'O_2).

Il est possible aussi que cet enzyme intervienne indirectement en déterminant la concentration du G-6-P qui contrôle l'activité de HK.

L'aldolase par sa faible activité détermine (selon BLANCHAER) (23) la vitesse globale de la glycolyse.

---

* — « Feed back control ».

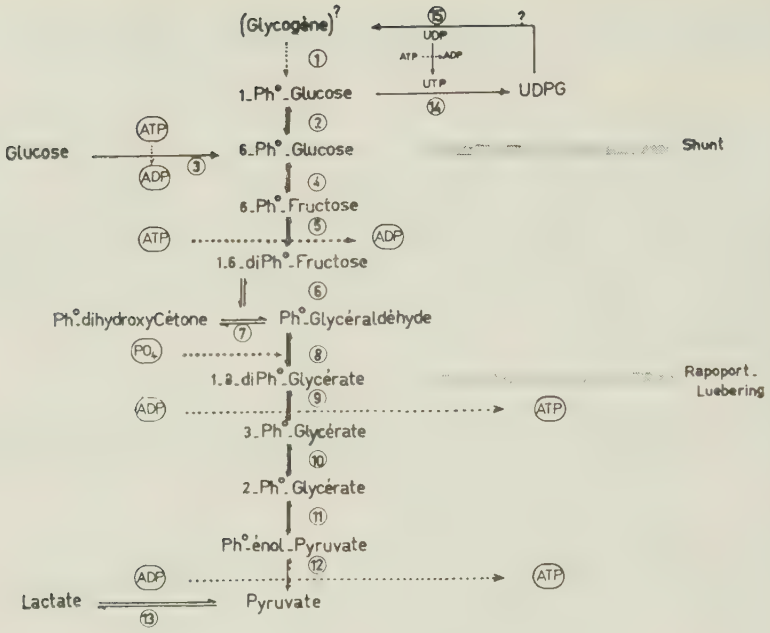


FIG. 9

Schéma de la Glycolyse d'Emden-Meyerhof

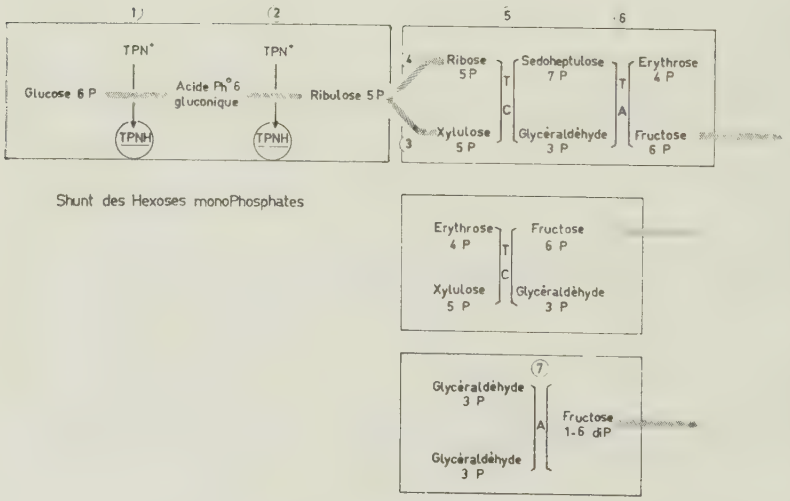


FIG. 10

Le Shunt des hexoses monophosphates

Deuxième partie

✳

EXPOSÉ ET DISCUSSION

DES TECHNIQUES

✳

CHAPITRE I

LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

I. — LES TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

L'anticoagulant :

Le sang a été recueilli :

— soit sur le mélange ACD utilisé dans les « banques de sang » * à raison de 75 ml d'anticoagulant pour environ 400 ml de sang ;

— soit sur héparine, à raison de 0,1 mg d'héparinate de sodium (c'est-à-dire 13 unités) par ml de sang.

L'influence de l'anticoagulant sera discutée plus loin.

Lavage des globules rouges :

Le prélèvement est centrifugé à faible vitesse (1 500 g pendant 15 mn) dans une centrifugeuse refroidie à 0°, aussitôt que possible après le prélèvement. Le plasma est décanté et la fine couche de leucocytes qui surnage est aspirée.

Le plasma résiduel est éliminé par deux lavages successifs du culot avec une solution isotonique de chlorure de potassium (11,5 g par litre) refroidie à 0°. Chaque fois le culot est centrifugé pendant 20 minutes, à 1 500 g au froid.

L'incubation des globules rouges :

Le marquage des hématies est réalisé par addition au milieu d'incubation de radiophosphate $^{32}PO_4HNa_2$ (sans entraîneur, fourni par le C.E.A.). Pour éliminer des traces de pyrophosphates (que l'on constate à peu près constamment), la préparation est chauffée à 100° pendant 20 minutes en milieu HCl N puis, après refroidissement, neutralisée par NaOH N.

Les doses de ^{32}P ajoutées varient selon la technique d'incubation : pour des incubations courtes (inférieures à 5 mn à 37°), nous ajoutons à chaque ml de milieu extracellulaire (hématocrite 50) 10 à 20 microcuries de ^{32}P. Pour des durées supérieures à 5 minutes, 1 à 1,5 microcuries.

---

* Composition du milieu ACD :

acide citrique	1,66 g
soude	0,65 g
glucose anhydre	3,00 g
eau distillée	100 ml

Le milieu d'incubation :

I. **Milieu normal :**

a) Le plasma lui-même. Dans les conditions de prélèvement sur ACD, il est dilué de 15 % par l'anticoagulant.
Dans la plupart des cas, le sang est « reconstitué », c'est-à-dire que les globules rouges lavés par centrifugation sont replacés dans un milieu de volume égal (hématocrite 50).

b) Le milieu est une solution isotonique soit de NaCl (9 g/litre) soit de KCl (11,5 g/litre) amenée à pH 7,4.

c) Dans certaines expériences, la solution physiologique a été glucosée : 1 mg de glucose par ml.

2. **Milieu modifié :**

a) Surcharge en glucose : par addition de glucose à du plasma, ou à une solution physiologique.

b) Surcharge en PO_4 : réalisée par addition à une solution physiologique de concentration double de l'isotonique, de volumes variables d'une solution mère de PO_4H_2K de titre connu.

c) Surcharge en inhibiteurs : les différents inhibiteurs sont ajoutés au sang total et la concentration plasmatique finale est calculée à partir de l'hématocrite. Une préincubation de 1 heure à 37° précède généralement l'introduction de ^{32}P et de PO_4 : les globules sont centrifugés après la préincubation et remis en suspension dans le milieu d'expérience (hématocrite 50).
Chaque expérience comportant un milieu modifié est doublée d'un témoin en milieu d'incubation normal.

Les concentrations des substances introduites dans le milieu sont exprimées par rapport au volume extracellulaire (et non par rapport au volume plasma + globules).

Le pH :

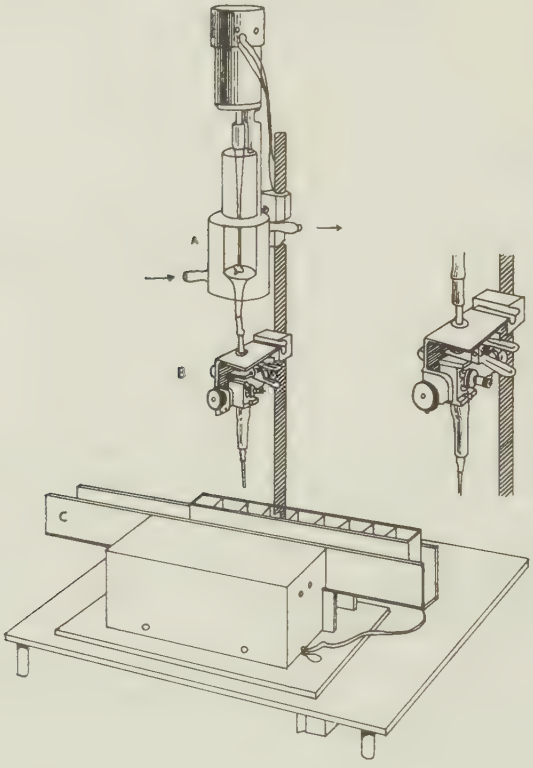
Le prélèvement sur ACD abaisse légèrement le pH extracellulaire, les autres anticoagulants ne le modifient pas. Bien que les expériences soient pour la plupart conduites en milieu non tamponné, les contrôles de pH en fin d'incubation montrent que les variations sont très faibles, inférieures à 0,1 unités de pH.

Les conditions d'incubation :

L'incubation est généralement réalisée en fioles d'Erlenmeyer bouchées et siliconées. La température est réglée par un thermostat de WARBURG à $\pm$ 0,05° C.

Dans les expériences de longue durée (supérieure à 1 heure) les fioles sont agitées toutes les 10 minutes environ. Dans les expériences de plus courte durée, elles sont agitées par l'appareil de WARBURG (60 oscillations/minute environ).

Dans les expériences de très courte durée, la vitesse d'incorporation a été mesurée en utilisant un montage de prélèvement particulier reproduit ci-dessous.



Cet appareil comporte :

— Une cuve d'incubation A munie d'un agitateur à hélice à rotation lente (60 t/mn) et thermostatée par une circulation contrôlée d'eau à 37°. (Le bain-marie et le circuit d'eau alimenté par une pompe à circulation ne sont pas représentés.)

— Une microseringue, permettant d'introduire la solution de $^{32}PO_4$ dans la suspension globulaire à l'aide d'une longue aiguille plongeant au fond de la cuve A.

— Une vanne magnétique B, qui permet de prélever instantanément le sang de la cuve.

— Une rampe de prélèvement C, constituée par une glissière en plexiglas transparent, cloisonnée en 12 compartiments égaux et qui se déplace d'un mouvement longitudinal, à l'aide d'un micromoteur à vitesse réglable.

— Un système de microcontacts permet de déclencher en synchronisme l'introduction du $^{32}PO_4$, le mouvement de la rampe et l'ouverture de la vanne magnétique.

Les compartiments de la rampe sont garnis avec de l'acide perchlorique à 20 %, refroidi à — 5° C. L'échantillon de sang subit une préincubation dans la cuve, de 15 minutes environ (pour équilibrer sa température), et le sang, après introduction du $^{32}PO_4$ est recueilli dans l'acide perchlorique refroidi. Les volumes d'acide perchlorique sont calculés en fonction du débit de l'appareil pour obtenir une concentration finale de défécat de 4 pour cent environ en acide.

Le contenu de chaque compartiment est aussitôt réparti dans des tubes à centrifuger refroidis à — 5° C et centrifugé.

La fraction acido-soluble surnageante est soumise immédiatement à l'analyse.

Dans certaines expériences, pour permettre la détermination du P de la cellule et du plasma le prélèvement a été fait directement dans une solution saline isotonique refroidie. Les globules ont été immédiatement séparés par centrifugation au froid.

Toutes les analyses sont réalisées au froid : surtout dans les étapes où le milieu est acide (certains phosphodérivés risquent de s'hydrolyser rapidement), la solution est maintenue à une température inférieure à + 4° C.

Le lavage des cellules après incubation :

En fin d'incubation, la suspension globulaire est transvasée dans un tube à centrifuger refroidi à — 5° C et aussitôt centrifugée à — 3° C (5 minutes à 3 000 tours). Le culot est lavé trois fois avec une solution saline isotonique refroidie, pour éliminer le $^{32}PO_4$ extracellulaire.

Les liquides surnageants des centrifugations sont rassemblés.

Le pourcentage d'échange est calculé :

$$\frac{\text{C.M./ml G.R.}}{\text{(C.M./ml G.R.)} + \text{(C.M./ml/surnageant)}} \times 100$$

(dans les cas où l'hématocrite est égale à 50).

Comme il est indispensable d'immobiliser la répartition du ^{32}P dès la fin de l'incubation, la radioactivité des globules est déterminée sur l'extrait acido-soluble : nous avons vérifié que l'activité résiduelle du culot protéique de la défécation perchlorique lavé est très faible et n'entache pratiquement pas d'erreur l'expression de l'échange.

La défécation :

I. **Défécation perchlorique :**

Un échantillon de 2 ml de globules rouges lavés est hémolysé avec 1 ml d'eau distillée et une trace de saponine : après 5 minutes de contact, on ajoute 1,5 ml de PCA à 20 % (acide perchlorique = PCA), puis 2 ml d'eau distillée et on agite. Après 15 minutes de contact, le précipité est centrifugé, le culot rincé deux fois par centrifugation avec 2 ml de PCA à 3 % (pour éviter une redissolution partielle du précipité). Les surnageants sont transvasés dans une fiole jaugée de 10 ml et complétés à ce volume.

L'analyse de l'extrait acido-soluble doit être poursuivie aussi rapidement que possible. Il n'y a pas intérêt à neutraliser l'extrait par KOH (et éliminer le perchlorate insoluble) : en manipulant rapidement et au froid, l'extrait ne s'hydrolyse pas. Par ailleurs, l'adsorption ultérieure sur charbon doit se faire en milieu acide.

2. **Défécation trichloracétique :**

Dans la séparation des esters phosphoriques par chromatographie sur papier, l'extraction trichloracétique nous a paru préférable. La défécation est conduite comme précédemment en précipitant par un volume d'acide trichloracétique (= TCA) à 20 % égal à celui des globules. L'acide peut être éliminé par quatre agitations en présence d'éther éthylique, les traces d'éther de la phase aqueuse étant chassées par un courant d'azote. L'extrait est finalement neutralisé à pH 7,0 par la soude.

II. — LES TECHNIQUES DE DOSAGE :

Le dosage du phosphore :

Trois techniques de base ont été adoptées et les conditions de leur application seront précisées :

a) La méthode de FISKE et SUBBAROW (75).

Cette technique est trop classique pour qu'il soit utile d'en rapporter les détails. Nous opérons toujours sur un volume final compris entre 5 et 25 ml. En fiole de 25 ml, son domaine d'application est compris entre 20 et 200 γ, et sa précision de l'ordre de 0.5 %.

b) La méthode de MARTIN et DOTY (154).

C'est une variante de celle de BERENBLUM et CHAIN (17) mais de réalisation plus aisée. Son domaine d'application s'étend entre 1 et 8 γ et sa précision est inférieure à 1 %.

Réactifs : —	Isobutanol	1 volume
	Benzène	1 volume
—	SO_4H conc.	8 ml
	Ethanol absolu	qsp. 250 ml

— Réactif stanneux :
100 mg d'étain en pastilles sont dissous à chaud dans 2 ml d'HCl concentré. La solution est amenée au volume de 20 ml avec SO_4H_2 normal.

Ce réactif doit être préparé extemporanément et ne peut être conservé plus de quelques heures.

Technique : une prise d'essai inférieure à 2 ml (généralement 1 ml de l'extrait PCA) est neutralisée par de la soude N et complétée à 3 ml. On ajoute successivement :

— 0,5 ml de SO_4H_2 5 M ;

— 5 ml du mélange (isobutanol-benzène) ;

— 0,5 ml. de molybdate d'ammonium à 10 %.

Le mélange est agité vigoureusement pendant 20 secondes et on laisse décanter les couches. On prélève dans un tube à essai de 10 ml bouché émeri :

— 2 ml de la couche (isobutanol-benzène) ;

et on ajoute

— 3 ml de l'alcool sulfurique.

La coloration bleue est lue au photomètre à 700 mμ, immédiatement après l'addition et le mélange de :

— 0,5 ml de réactif stanneux.

Pour chaque série de dosages, une courbe d'étalonnage est établie dans les mêmes conditions à partir d'une solution étalon de PO_4H_2K.

c) La méthode de BARTLETT (13) :

Cette technique a été utilisée pour doser le phosphore total des extraits ou des chromatogrammes sur papier.

1. Destruction : 2 ml de l'extrait perchlorique sont prélevés dans un tube à essai et additionnés de 0,5 ml de SO_4H_2 10 N. Le tube est chauffé à l'étuve à 160° C pendant 3 heures. Après addition de 2 gouttes de perhydrol MERCK, le tube est chauffé à nouveau à 160° C pendant au moins deux heures (pour décomposer les traces de peroxyde).

Dans le cas des taches de chromatographie, la technique de minéralisation est légèrement différente : la tache est placée dans un tube à essai avec 1 ml de PCA à 50 % et 1 ml d'eau distillée. Le tube est chauffé à l'étuve à 115° C jusqu'à obtention d'une solution homogène. On ajoute alors 3 gouttes d'acide nitrique concentré et l'on chauffe prudemment sur un microbunsen jusqu'à évaporation complète. Le résidu est repris par 0,5 ml d'acide sulfurique 10 N.

2. Dosage :

On ajoute successivement :

— 4,6 ml de molybdate d'ammonium à 0,22 % ;
— 0,2 ml de réactif de FISKE et SUBBAROW (75).

On agite et place dans un bain-marie bouillant pendant 7 minutes (le tube étant recouvert d'une lamelle de microscope).

La coloration est lue après refroidissement au photomètre à 830 mμ, et la valeur rapportée à une courbe d'étalonnage. La coloration est stable pendant plusieurs heures.

Le domaine d'application est compris entre 0 et 5 γ avec une précision inférieure à 2 %. La sensibilité peut être doublée en divisant par deux le volume des réactifs.

La séparation des phosphodérivés :

— **La séparation sur résines anioniques**, selon BARTLETT :

La méthode proposée par BARTLETT (11) (12) est certainement celle qui permet la séparation la plus complète. Mais, outre son caractère laborieux, elle n'est applicable qu'à des échantillons d'un volume important (au moins 50 ml de globules rouges) : son seul avantage est de fournir une séparation des esters phosphoriques, fraction dont les variations présentent moins d'intérêt que celles des nucléotides. D'autre part cette séparation étant réalisable selon une technique mise au point au laboratoire, nous n'avons employé la séparation de BARTLETT que pour confirmer la répartition fournie par cet auteur. La technique a été appliquée sans modifications : aussi nous bornerons-nous à en rappeler le principe, en renvoyant au travail original pour les détails techniques.

La séparation est effectuée à partir d'un extrait TCA, soumis à un fractionnement sur une colonne de DOWEX 1, forme Cl. Les composés phosphorés retenus sont ensuite élués selon un gradient linéaire, en utilisant successivement :

(1) HCl 0,003 N
(2) HCl 0,01 N
(3) HCl 0,02 N
(4) NH_4Cl 0,1 N
(5) NH_4Cl 0,2 N
(6) NH_4Cl 0,5 N
(7) HCl 1 N

Certaines fractions d'élution sont soumises à de nouvelles chromatographies pour obtenir une séparation plus fine des intermédiaires de la glycolyse.

Dans la fraction :

(1) on sépare en particulier PO_4 et les hexoses monophosphates ;
(2) l'ADP et les monophosphoglycérates (2-PG et 3-PG) ;
(3) 1,6 GDP et le 1,6 FDP ;
(4) 2,3 DPG ;
(5) ATP.

La fraction (6) représente un composé inconnu de nature nucléotidique.

— **La séparation de groupes : (esters + PO_4) et nucléotides :**

— Dans nos expériences, nous avons dosé la fraction PO_4 et déterminé son activité spécifique directement, puisque l'extraction butanolique de la méthode de MARTIN et DOTY permet de l'isoler. La séparation est effectuée sur 1 ml de l'extrait perchlorique non neutralisé.

— La fraction ester nous a paru rapidement présenter peu d'intérêt car elle n'incorpore que très lentement le PO_4 extracellulaire : dans la plupart des cas, elle a été déterminée par différence. Ce dosage consiste à adsorber les nucléotides sur charbon, et à déterminer le phosphore total sur la fraction non adsorbée. Cette fraction comprend les orthophosphates et les esters : la teneur en esters phosphoriques est déterminée par différence entre le phosphore total et le P (PO_4) apprécié indépendamment.

— L'adsorption sur charbon des nucléotides a été préconisée par CRANE et LIPMAN (53). Nous avons adopté la technique proposée par TRELFALL (226).

La séparation est réalisée sur une microcolonne et l'élution très lente est effectuée par une solution aqueuse de pyridine à 0° C pour éviter une hydrolyse possible par l'éluant alcalin.

Nous procédons de la manière suivante :

Le charbon (Norit PROLABO, ou ACTIVIT X) est au préalable purifié par chauffage à l'ébullition en présence d'acide acétique dilué au demi, puis lavé longuement jusqu'à neutralité des eaux de lavage, et séché à l'étuve à 100° C.

La phase adsorbante est constituée par un mélange à poids égaux de charbon et de terre d'infusoire (soumise comme le charbon à un traitement par l'acide acétique).

200 mg du mélange homogène sont tassés à sec dans une colonne de faible section (diamètre intérieur d'environ 2,5 mm), garnie à sa partie inférieure d'un petit tampon de coton de verre. Cette colonne, de 20 cm environ, est munie à sa partie supérieure d'un renflement de 10 ml, à rodage normalisé. Six colonnes identiques sont disposées sur une rampe de distribution à rodages mâles correspondants qui permet d'appliquer une pression de 40 cm de mercure, et fournit un débit régulier d'environ 0,2 ml par minute.

La colonne est désactivée par passage de 5 ml d'une solution d'octanol secondaire à 8 % dans l'éthanol à 95°, puis rincée par 1 ml d'eau distillée. On fait alors passer sous pression 6 ml de l'extrait perchlorique non neutralisé, et on rince la colonne par 1 ml d'eau distillée.

— Sur la fraction non adsorbée, le phosphore total est dosé par la technique de BARTLETT, après destruction (13).

— La fraction nucléotidique est éluée par 5 ml d'une solution aqueuse de pyridine à 10 %. L'éluat est immédiatement évaporé sous vide à une température inférieure à 22° C, à l'aide d'un évaporateur rotatif du type CRAIG. Le résidu de l'évaporateur est repris par 0,4 ml d'eau distillée et soumis à la séparation chromatographique.

— La séparation des nucléotides adényliques :

Elle est réalisée par chromatographie sur papier Whatman N° 1 (exceptionnellement sur n° 3 ou 3 MM), préalablement lavé par l'acide chlorhydrique, selon MORTIMER (162), puis par l'EDTA, selon KREBS et HEMS (136). La chromatographie descendante est effectuée simultanément sur cinq extraits et un mélange étalon en quantités équimoléculaires (AMP/ADP/ATP).

La solution à chromatographier est disposée en une traînée de 15 mm environ : elle correspond à 0,040 ml de l'extrait. Deux solvants ont été employés, à la température de 20° C environ :

1. Le solvant de KREBS et HEMS (137) :

acide isobutyrique	66 volumes
eau distillée.....	33 volumes
ammoniaque concentrée d = 0,90 ...	1 volume

La durée de migration est d'environ 15 heures.

2. Le solvant de PALADINI et LELOIR (178) :

acétate d'ammonium 1 M	3 volumes
éthanol à 95°	7,5 vol.

A 20° C, la durée de migration est d'environ 20 heures. Le solvant 1 permet une excellente séparation des trois nucléotides adényliques, sans traînées. Toutefois, les orthophosphates migrent dans une zone comprise entre l'ADP et l'ATP. Ce n'est pas une cause d'erreur éventuelle, lorsque l'on opère sur des extraits où PO_4 a été éliminé au préalable par adsorption sur charbon. Dans certaines expériences où cette séparation des orthophosphates n'avait pas été réalisée, nous avons préféré le solvant 2 : les orthophosphates n'interfèrent plus car ils migrent très au-dessous de la zone des nucléotides. Ce second solvant nous a d'ailleurs permis de vérifier la validité de la méthode d'adsorption sur charbon.

Les taches nucléotidiques sont repérées sur le chromatogramme (après séchage à l'étuve à 100° C, jusqu'à disparition de l'odeur caractéristique de l'isobutyrate) par l'examen en lumière ultraviolette (MINERALIGHT).

— Chaque tache, découpée finement, est répartie en monocouche sur le fond d'une cupule de cuivre nickelé : la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur cloche.

— Les fragments de papier sont ensuite élués par contact de 2 heures à 20° C, avec 5 ml d'HCl N/10. La solution surnageante après centrifugation est décantée, et l'absorption est mesurée au spectrophotomètre de BECKMANN DU, à 260 mμ, et à 290 mμ.

La cuve témoin est garnie d'une solution obtenue en éluant dans des conditions identiques une surface équivalente de papier Whatman N° 1 lavé.

La concentration en dérivés adényliques est calculée selon la méthode dite « d'extinction différentielle » de VISCHER et CHARGAFF (235), qui consiste à corriger l'absorption au maximum (257 mμ) de l'absorption résiduelle à 290 mμ. Les résultats sont exprimés :

— soit en adénine, 1 γ correspondant à une différence de densité optique de 0,104 ;

— soit en phosphore (suivant les cas, P total du nucléotide, ou P à liaison riche en énergie).

Ces valeurs permettent de calculer et d'exprimer la concentration des diverses fractions soit en γ par ml de globules rouges, soit en μ moles par ml de globules.

La mesure des activités des P α, β et γ de l'ADP et de l'ATP :

La séparation par chromatographie sur papier selon les techniques précédentes permet de calculer une activité spécifique moyenne des trois phosphores de l'ATP et des deux de l'ADP. En réalité, en raison de l'incorporation plus lente dans l'AMP (et dans les P α de l'ADP et de l'ATP), la participation du P α peut être négligée lorsque l'expérience est de courte durée (inférieure à une heure) : l'activité spécifique est alors rapportée aux P riches en énergie (liaison pyrophosphate des P β et γ), mais elle représente une moyenne de l'activité de ces deux phosphores.

Dans certaines expériences, nous avons dû déterminer séparément l'activité spécifique des trois P de l'ATP : nous avons utilisé alors la technique de TSUBOI (230) : cette séparation comporte une chromatographie en trois solvants successifs :

— Une première séparation est effectuée avec le solvant 1 (isobutyrate d'ammonium), comme précédemment.

— Après séchage de la feuille, une hydrolyse partielle est réalisée en pulvérisant sur la feuille un mélange HCl 0,10 N (10 volumes)/Ethanol

(90 volumes). Le chromatogramme est placé à l'étuve à 100° C pendant 16 heures.

— Les produits de l'hydrolyse partielle sont séparés par une seconde chromatographie en solvant 1 (isobutyrate d'ammonium), effectuée selon l'autre dimension de la feuille.

Pour éliminer les orthophosphates provenant de l'hydrolyse des nucléotides, on réalise une troisième chromatographie dans la même dimension que la seconde. Le solvant utilisé déplace très peu les nucléotides, mais PO_4 migre très rapidement :

Isopropanol	60 volumes
Acide acétique glacial	30 volumes
Eau distillée	10 volumes

(durée à 20° C : 16 heures environ).

Les taches de nucléotides sont repérées, découpées et éluées par 5 ml d'HCl N/10. La concentration en nucléotides est mesurée par la méthode d'absorption différentielle (Cf. plus haut) et la radio-activité est déterminée sur une fraction du liquide d'élution.

Calcul des activités spécifiques P α, β, γ :

— l'A.S. de P α de l'AMP est fournie directement ;

— l'A.S. du P β :

A.S. $(\alpha + \beta)/2$ = A.S. moyenne P $\alpha + \beta$;

A.S. P β = (A.S. moyenne $\times$ 2) - A.S. P α ;

— l'A.S. du P γ :

A.S. $(\alpha + \beta + \gamma)/3$ = A.S. moyenne P $\alpha + \beta + \gamma$;

A.S. P γ = (A.S. moyenne $\times$ 3) - A.S. $(\alpha + \beta)$.

La séparation des esters phosphoriques :

Elle comporte :

— la séparation des divers constituants de la fraction acido-soluble par chromatographie sur papier ;

— la révélation des taches par autoradiographie ;

— le dosage du P total des taches (selon BARTLETT) et la mesure de la radio-activité.

— Séparation chromatographique :

Les séparations sont réalisées selon GERLACH (82) sur papier Whatmann n° 1 lavé, en chromatographie descendante. Trois solvants sont employés : *

* Tous les solvants chromatographiques sont redistillés peu avant leur emploi.

— solvant 1 : Ethanol : 8 ml dans lesquels sont dissous 18 mg d'oxyquinoléine.

n- propanol	25 ml
n- butanol	27 ml
NH_4OH à 25 %	30 ml
eau distillée	10 ml
sol. d'EDTA 0,1 M	0,2 ml

— solvant 2 :

Ethanol	5 ml
n- propanol	25 ml
n- butanol	30 ml
NH_4OH à 25 %	30 ml
eau distillée	10 ml

— solvant 3 :

TCA à 30 %	15 ml
acide formique à 80 %	25 ml
n- butanol	40 ml
n- propanol	20 ml
acétone	25 ml

160 à 200 mm^3 de l'extrait TCA de 2 ml de globules rouges sont déposés à l'intersection de deux lignes distantes de 9 cm des bords de la feuille. La première chromatographie est réalisée avec le solvant 1, après une période d'équilibration de deux heures avec le solvant. La durée de migration descendante est d'environ 40 heures.

La feuille, séchée à la température du laboratoire, est soumise à une chromatographie dans la même dimension avec le solvant 2, pendant 24 heures.

Après un nouveau séchage, la feuille est chromatographiée avec le solvant 3 pendant 12 heures, dans la dimension perpendiculaire, puis séchée à l'étuve à 100° C pendant 4 heures.

— **Localisation des taches :**

Le chromatogramme est placé en contact direct avec un film Regulix HS (KODAK) 30 × 40, et le film développé au bout de 24 à 48 heures selon l'activité initialement utilisée. Un calque du radio-autogramme est reporté sur le chromatogramme, et les taches ainsi localisées sont découpées.

— **Dosage du P total :**

Des surfaces identiques de papier sont découpées dans le chromatogramme, en dehors des zones marquées : elles serviront à corriger les résultats des traces éventuelles de P persistant malgré le lavage acide préalable.

Les taches sont détruites et le P total déterminé selon la technique de BARTLETT (Cf. plus haut).

La radio-activité est mesurée directement sur les taches découpées en petits morceaux et disposées sur le fond d'une cupule en monocouche.

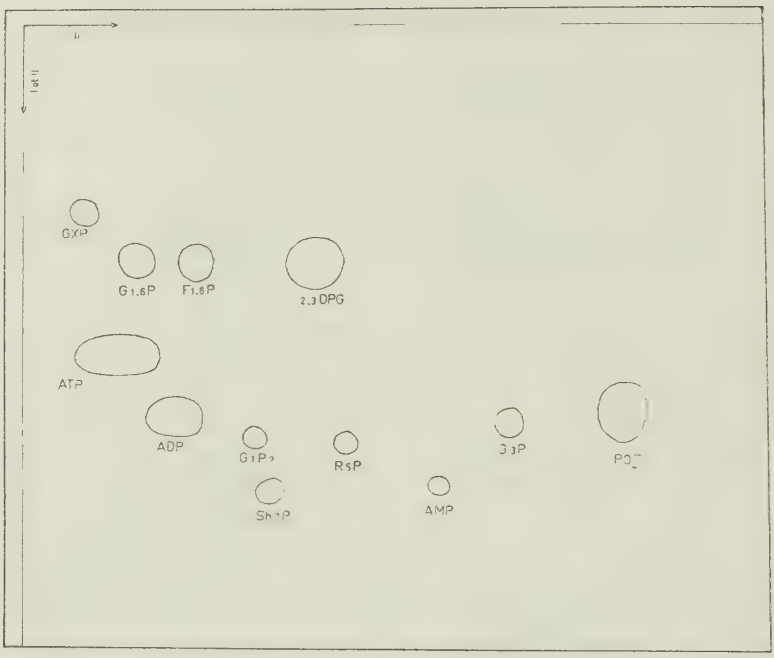


FIG. 11

Séparation par chromatographie bidimensionnelle des composés phosphorés acido-solubles du globule rouge humain

La carte de répartition des taches a été établie au laboratoire par Mme TEMKINE (225) que nous tenons à remercier de ses conseils.

CHAPITRE II

DISCUSSION DES TECHNIQUES

I. — DISCUSSION DES TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES :

1. Le choix de l'anticoagulant :

Pour des raisons de commodité de prélèvement (voir page 6), nous avons utilisé soit le mélange ACD, soit l'héparinate de sodium. En comparant les teneurs en orthophosphate de sang prélevé sur ces deux anticoagulants, nous avons été frappés par des différences très importantes : avec l'ACD, la concentration en P (PO_4) est beaucoup plus élevée (1,05 µmol/ml ± 0,24) qu'avec l'héparinate de sodium (0,33 µmol/ml ± 0,08).

Cette observation nous a conduit à étudier l'influence des divers anticoagulants sur la perméabilité aux ions PO_4^{---} et sur le métabolisme phosphoré des globules rouges (41). Nous avons constaté que l'héparine (ainsi d'ailleurs que le citrate, le liquoïde, l'EDTA ou le froid) ne modifie ni la perméabilité ni l'incorporation secondaire du phosphore dans les dérivés de la glycolyse. Au contraire, le mélange ACD augmente la perméabilité et affecte également la glycolyse : la recharge de l'ATP et l'équilibre ATP/ADP/AMP sont normaux, mais la concentration des esters et leur turnover diminuent très nettement. Une étude plus complète de ce phénomène montre qu'il est imputable aux variations du pH du milieu, le mélange ACD ayant un caractère acide (41).

Nous n'avons donc utilisé le mélange ACD que dans certaines expériences où un volume du sang important était nécessaire : en général, dans des expériences de contrôle nécessitant des fractionnements chromatographiques sur DOWEX. Toutes les expériences de cinétique d'incorporation ont été effectuées avec du sang prélevé sur héparinate de sodium.

2. Le choix du milieu d'incubation :

Pour suivre plus aisément le passage des ions PO_4^{---} dans le globule, pour faire varier d'une manière précise la concentration extracellulaire, pour fixer avec rigueur la valeur de l'hématocrite, il nous a semblé préférable de substituer au milieu plasmatique, trop complexe et variable, un milieu physiologique simple, telles les solutions isotoniques de chlorure de sodium ou de potassium.

Toutefois, nous nous sommes assuré au préalable que la cinétique de la perméabilité aux ions PO_4^{---} était indifférente à la composition du milieu extracellulaire. Nous avons comparé quatre milieux :

— plasma sanguin ;
— chlorure de sodium à 9 g par litre ;

— chlorure de potassium à 11,5 g par litre ;

— solution physiologique de KREBS (135) et mesuré le pourcentage d'échange en fonction du temps, à quatre températures d'incubation (0°, 15°, 30° et 40°).

Nous ne détaillerons pas cette étude : les courbes de la fig. 12 résument les résultats obtenus. Elles montrent que la cinétique de la perméabilité (et la répartition du phosphore dans les diverses fractions intracellulaires, qui ne figure pas ici) est la même avec le plasma, le chlorure de potassium et le liquide de KREBS. Mais elle accuse des différences très nettes avec le chlorure de sodium isotonique. Dans ce dernier cas interfère un processus plus complexe lié vraisemblablement au transport actif de l'ion Na^+ (son exclusion du milieu cellulaire est couplée avec la glycolyse, donc avec le métabolisme des phosphates) qui explique les anomalies observées :

C'est pourquoi nous avons adopté le chlorure de potassium isotonique, puisque le globule rouge s'y comporte comme dans le plasma ou un milieu isotonique polyionique équilibré du type KREBS.

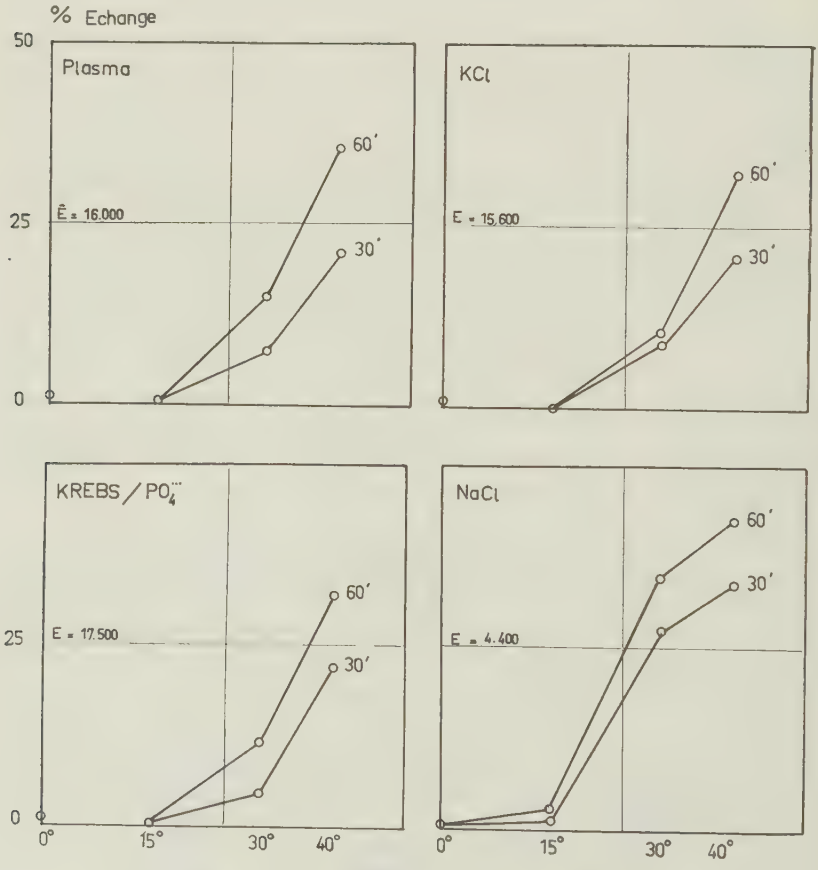


FIG. 12

Influence de la composition du milieu extracellulaire sur la perméabilité aux ions orthophosphates du globule rouge humain

(E représente les énergies d'activation calculées entre 30 et 40°C)

II. — DISCUSSION DES TECHNIQUES ANALYTIQUES :

1. La défécation :

La précipitation des protéines des globules rouges par l'acide perchlorique (PCA) à 20 % dans les conditions techniques décrites permet une extraction quantitative des dérivés acido-solubles sans hydrolyse appréciable des composés les plus labiles. En particulier, nous avons vérifié (38) par le marquage au ^{32}P que le culot ne conserve plus, après un rinçage au PCA 3 %, qu'une activité résiduelle de 1,4 % (tableau XI).

TABLEAU XI

Activité résiduelle du culot de défécation perchlorique, après lavage à l'acide perchlorique dilué

(Les temps indiqués représentent les durées d'incubation des globules rouges à 37°, en présence de radiophosphates)

Activité initiale : 829 000	Incubation			Moyenne	p. 100
	1 heure	2 heures	4 heures		
Culot lavé à l'acide perchlorique dilué :					
1 fois	27 600	29 000	34 400	30 300	3,6
2 fois	9 000	11 400	15 400	11 900	1,4

Cette activité résiduelle du culot protéique est due en partie à des dérivés étrangers au métabolisme glucidique (phospho-protéines).

L'acide perchlorique présente sur l'acide trichloracétique deux avantages :

— il peut être facilement éliminé par précipitation du perchlorate de potassium insoluble, alors que l'élimination de l'acide trichloracétique nécessite des extractions laborieuses par l'éther, ou mieux par l'acétate de butyle (252) ;

— il n'absorbe pas dans l'ultra-violet, alors que l'acide trichloracétique est peu transparent à 260 mμ.

Toutefois, dans certains cas, nous avons employé l'extraction trichloracétique : en particulier, dans la séparation par chromatographie sur papier des esters selon GERLACH (82), nous avons conservé cette défécation préconisée par l'auteur et qui nous a semblé fournir une résolution meilleure des chromatogrammes.

2. La séparation des fractions phosphorées de l'extrait perchlorique.

Il est maintenant évident que l'on ne peut plus se contenter, pour déterminer la répartition du P acido-soluble, de méthodes basées sur

l'hydrolyse différentielle des phosphodérivés : une séparation plus ou moins complète doit précéder le dosage du phosphore, et cette séparation devient indispensable si l'on désire mesurer l'activité des différentes fractions. Le fractionnement basé sur la solubilité des sels de Ba, de Pb ou de Hg doit être rejeté, car il donne lieu à des précipitations incomplètes ou à des co-précipitations variables avec la concentration de chaque constituant : les séparations sont de ce fait ou incomplètes ou erronées (89) (9).

Les premiers, CRANE et LIPMAN (53) ont signalé que le charbon adsorbe fortement les nucléotides de l'extrait acido-soluble laissant en solution PO_4 et les esters phosphoriques, à condition, comme l'a souligné ultérieurement CRANE (55) que l'extrait demeure acide. Les avantages de cette technique sur les méthodes laborieuses de séparation plus anciennes sont évidents. Toutefois, cette séparation de groupes présente certains inconvénients.

Si l'adsorption est totale, l'élution n'est pas toujours quantitative. Le rendement d'élution est lié à de multiples facteurs :

— la nature du charbon, sa dureté et sa porosité (voir en particulier BARTLETT (12) ;

— l'éluant : deux types principaux sont employés :
soit un mélange éthanol/eau/ammoniaque ;
soit un mélange pyridine/eau.

Avec le mélange ternaire, BARTLETT (12) obtient un rendement de 80 à 90 %, PETHIYAGODA (184) 80 à 95 %. Le second éluant, proposé par THRELFALL (226), permet des rendements plus élevés et pratiquement quantitatifs : toutefois, la forte absorption de la pyridine dans la région de 260 mμ, rend nécessaire son élimination totale par évaporation ou extraction à l'éther.

— la technique d'élution : il est pratiquement impossible, quel que soit l'éluant, de récupérer plus de 90 % des nucléotides lorsqu'on opère par centrifugation de fractions successives d'éluant. Nous avons vérifié que l'élution est quantitative avec le mélange pyridine/eau (10/90), à condition :

1. D'inactiver partiellement le charbon (Activit) par l'octanol, pour faciliter ultérieurement l'élution.

2. De réaliser la séparation sur une microcolonne à chromatographie, garnie du mélange désactivé de charbon et d'Hyflosupercel à parties égales en poids.

Les diverses fractions nucléotidiques de l'extrait acido-soluble des tissus, adsorbées sur charbon, ne sont pas toujours éluées simultanément : les dérivés uridyliques, par exemple, sont difficilement détachés du charbon par les éluants classiques. Mais, dans le cas du globule rouge, ces nucléotides sont en concentration très faible et leur signification métabolique est plus

restreinte que celle de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP. Aussi n'avons nous pas cherché à les doser.

PETHIYAGODA (184) a signalé que le passage sur charbon d'un extrait nucléotidique modifie ultérieurement les caractères d'adsorption sur DOWEX de l'ADP et de l'ATP : nous avons vérifié que cette anomalie ne se retrouve pas lors de la séparation par chromatographie sur papier.

Dans les conditions expérimentales que nous avons décrites, nous avons vérifié que :

1. L'adsorption des nucléotides de l'extrait perchlorique est quantitative : la fraction non adsorbée présente une absorption nulle à 260 mμ.

2. Les orthophosphates et les esters ne sont pas retenus par le charbon lorsque l'extrait est acidifié selon les données de CRANE (55).

3. L'élution pyridinique de la colonne est totale : une seconde élution n'entraîne plus de nucléotides. D'autre part, les concentrations en adénine déterminées directement sur l'extrait perchlorique et sur l'éluat sont identiques (38).

4. La somme des radioactivités de l'éluat et du non-absorbé sur charbon correspond, à 5 pour cent près, à la radioactivité mesurée directement sur l'extrait perchlorique. Compte tenu de la précision habituelle des mesures de radioactivité, on peut estimer que la récupération est quantitative.

3. **La séparation des nucléotides par chromatographie sur papier.**

Nous avons effectué la séparation des trois dérivés adényliques par chromatographie sur papier Whatman n° 1 ou 3, en utilisant deux solvants :

— soit le solvant de KREBS et HEMS (137) ;

— soit le solvant de PALADINI et LELOIR (178).

Habituellement, c'est le premier que nous avons choisi. En effet :

— la séparation des trois dérivés adényliques est bonne : les valeurs de Rf sont les suivantes :

AMP	0,47
ADP	0,35
ATP	0,23

et d'autre part les taches sont bien délimitées, sans traînées. Nous avons vérifié que le solvant n'hydrolyse pratiquement pas les P labiles de l'ATP et de l'ADP. Il convient toutefois de signaler que les orthophosphates migrent entre l'ADP et l'ATP. Aucun inconvénient, lorsque les ortho. ont été éliminés par séparation sur le charbon — c'est le cas général — mais le solvant est alors inutilisable si l'on emploie l'extrait brut. Dans ce cas, le second solvant est plus indiqué.

— le solvant de PALADINI et LELOIR fournit également une excellente séparation sans hydrolyse. Les valeurs de Rf rapportées à l'adénosine sont :

AMP	0,54
ADP	0,26
ATP	0,13

Les orthophosphates migrent très loin $R_f \simeq I$; de ce fait, ils n'interfèrent pas avec les nucléotides.

4. Le dosage des nucléotides adényliques :

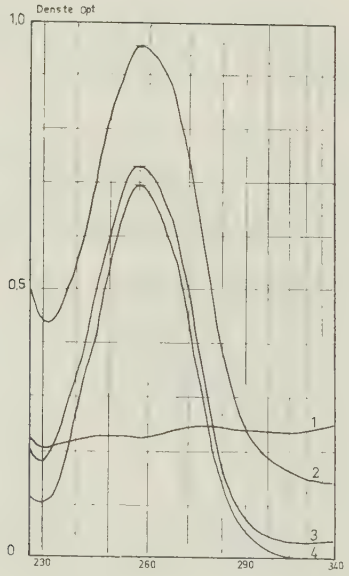


FIG. 13

Influence du papier Whatman n° 1 sur le spectre des dérivés adényliques
(après élution des taches de chromatographie)

1. - Eluat chlorhydrique de papier Wh 1.
2. - Eluat chlorhydrique de tache ATP.
3. - Spectre (2), corrigé du spectre papier (1).
4. - Solution ATP pure (de même concentration que (2) et (3).

Dans les conditions indiquées, l'élution chlorhydrique est complète, comme nous l'avons vérifié en dosant le P total soit sur l'éluat, soit sur le papier après minéralisation sulfonitrique : les valeurs trouvées concordent à 2 pour cent près. Pour éviter le microdosage du P dans les éluats, nous avons adopté la mesure de l'absorption ultra-violette de l'adénine : cette technique plus rapide permet en outre, en cas de doute, une vérification par le dosage ultérieur du P des nucléotides. La concentration en nucléotides ne peut être calculée à partir de la densité optique mesurée au maximum d'absorption (257 mμ, en milieu acide) que si aucune impureté ne fausse la mesure ; or, le papier Whatman, même soigneusement lavé, fournit un éluat chlorhydrique qui n'est pas parfaitement transparent entre 220 et 300 mμ (figure 13). Nous avons étudié l'influence de ces impuretés du papier sur la mesure spectrophotométrique de l'adénine en ajoutant, à une solution d'ATP pur, des concentrations variables d'éluat de Whatman n° 1 lavé : l'absorption est alors modifiée (figure 13). Au tableau XII, figurent les concentrations en adénine. Celles-ci sont calculées :

1° à partir de la densité optique à 260 mμ, en prenant la valeur $\alpha M = 14{,}3$ (colonne 1) ;

2° par la méthode de VISCHER et CHARGAFF (235) (qui utilise la différence d'absorption 262,5/290 mμ) : nous avons préféré choisir la différence entre l'absorption au maximum (257 mμ) et celle à 290 mμ, et recalculer le facteur correspondant : 1 μg d'adénine : $\Delta = 0{,}104$ (colonne 3). Enfin :

3° en mesurant l'absorption contre une cuve témoin renfermant une quantité sensiblement équivalente d'éluat chlorhydrique de papier, en calculant les concentrations soit directement à partir de α M (260 mμ) (colonne 2), soit par la méthode différentielle modifiée (colonne 4).

Ces résultats montrent qu'il est impossible d'utiliser le calcul direct à partir de l'absorption à 260 mμ. Lorsque la surface de la tache est importante (ATP surtout), la méthode différentielle de VISCHER et CHARGAFF est entachée d'une erreur assez élevée : 4 à 5 pour cent. La précision devient excellente en effectuant la mesure différentielle contre une cuve témoin renfermant une concentration équivalente d'éluat de papier. Dans ces conditions le spectre correspond à celui d'une solution d'ATP pur de concentration équivalente (fig. 13).

5. **La reproductibilité des données analytiques :**

Pour préciser la reproductibilité des diverses étapes du dosage et mesures d'activité, nous avons comparé des séries de déterminations en double et calculé les écarts exprimés en pourcentage par rapport à la valeur moyenne. La déviation standard de ces pourcentages d'écarts est établie selon la formule :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (d)^2}{n - 1}}$$

Ces valeurs sont rapportées dans le tableau XIII, qui met en évidence la bonne reproductibilité des mesures.

TABLEAU XII

Influence du papier Whatman n° 1 sur le dosage spectrophotométrique de l'ATP

(Les surfaces moyennes des taches de nucléotides, après séparation chromatographique sur papier Whatman n° 1 sont :
AMP ..... 6 cm^2
ADP ..... 6 cm^2
ATP ..... 11 cm^2

	I		II	
ATP (sol. pure)	6,35 µg			
ATP + 2,5 cm^2 Whatman I.....	6,79	+ 7,4 %	6,51	+ 3,0 %
ATP + 5,0 cm^2 —	7,13	+ 12,8 %	6,60	+ 4,4 %
ATP + 10 cm^2 —	7,60	+ 20,3 %	6,75	+ 6,8 %
ATP + 15 cm^2 —	8,83	+ 39,7 %	6,70	+ 6,0 %

	III		IV	
ATP (sol. pure)	6,32 µg			
ATP + 2,5 cm^2 Whatman I.....	6,27	— 0,8 %	6,32	0
ATP + 5,0 cm^2 —	6,32	0	6,27	— 0,8 %
ATP + 10 cm^2 —	6,58	+ 4,1 %	6,37	+ 0,8 %
ATP + 15 cm^2 —	6,66	+ 5,4 %	6,32	0

TABLEAU XIII

Déviation standard du pourcentage d'écart entre deux déterminations effectuées sur un même échantillon

	Nombre de déterminations	σ p. 100
Pourcentage d'échange	88	± 2,2
$P(PO_4)$	92	± 2,5
P(esters)	74	± 4,8
P(ATP)	78	± 6,3
P(ADP)	80	± 6,4
Activités spécifiques :		
$^{32}P(PO_4)$	90	± 3,2
^{32}P(ATP)	86	± 3,0
^{32}P(ADP)	88	± 4,7

6. **La séparation chromatographique des esters phosphoriques :**

Cette séparation, inspirée de la technique de GERLACH (82) est effectuée sur un extrait marqué par ^{32}P. La chromatographie, révélée par autoradiographie, montre la présence d'un nombre élevé de taches bien délimitées. L'identification de ces taches a dû être entièrement reprise. La carte de répartition des phosphodérivés, après séparation par chromatographie sur papier selon GERLACH, a été établie en utilisant les méthodes classiques :

— par surcharge de l'extrait avec le composé de référence et révélation chimique : la tache colorée se superpose à l'opacité du radiochromatogramme ;

— par modification des voies métaboliques :

Par exemple, l'addition de bleu de méthylène au milieu d'incubation des globules rouges favorise le shunt des hexoses monophosphates et accumule certains dérivés qui ne se trouvent normalement qu'à des concentrations faibles comme : ribose-5-P et sédoheptulose-7-P. De même, l'inhibition de la glycolyse par le mono-iodacétate entraîne une accumulation de fructose 1-6 diphosphate ;

— ou encore par des révélations spécifiques : les nucléotides sont facilement repérés par leur absorption en UV et par la comparaison de deux chromatogrammes du même extrait, effectués l'un avec l'extrait perchlorique total, l'autre avec l'éluat après séparation sur charbon.

Troisième partie

✳

EXPOSÉ DES RECHERCHES PERSONNELLES SUR LE MÉCANISME DE LA PERMÉABILITÉ AUX IONS ORTHOPHOSPHATES

✳

CHAPITRE I

LA FORMULE PHOSPHORÉE DES GLOBULES ROUGES

I. — LE COMPARTIMENT INTRACELLULAIRE MINÉRAL : PO_4^{---}

Lorsqu'on compare, dans la littérature, les valeurs de concentration des ions orthophosphates (PO_4^{---}) dans le plasma et les globules rouges, on est frappé par les considérables variations de la fraction intracellulaire, qui contrastent avec la stabilité des phosphates plasmatiques. Le tableau suivant (XIV) rassemble des valeurs parmi les plus représentatives de ces divergences.

Cette dispersion des valeurs normales du PO_4^{---} intracellulaire rend difficile l'interprétation des mécanismes de pénétration des ions phosphates à travers la membrane : selon qu'on accepte les valeurs basses ou élevées, la concentration intracellulaire est inférieure ou supérieure à la concentration plasmatique (qui oscille chez l'adulte normal entre 25 et 40 milligrammes de P par litre, soit 0,80 à 1,30 millimoles par litre). Dans le premier cas, une diffusion dans le sens du gradient potentiel électrochimique est possible. Dans le second, la pénétration contre un gradient de concentration ne peut qu'évoquer un mécanisme de transport actif, lié au métabolisme énergétique de la cellule.

Il est évident que nous ne pouvons discuter du mécanisme de pénétration des ions PO_4^{---} dans le globule si nous sommes incapables de définir le niveau normal du P (PO_4) intracellulaire. A ces divergences énormes de concentration, qui conduisent même certains auteurs à douter de la présence des orthophosphates dans le globule rouge (214), une explication devait d'abord être recherchée.

Deux hypothèses pouvaient être retenues :

— ou bien le globule ne contient pas de P (PO_4) libre ;

— ou bien la teneur normale est modifiée.

Dans les deux cas, les causes d'erreur sont :

— soit le plasma retenu lors de la centrifugation ;

— soit une modification de la perméabilité ou du métabolisme, provoquée par l'anticoagulant ;

— soit une hydrolyse de certains phosphodérivés particulièrement labiles au cours du prélèvement ou du dosage.

TABLEAU XIV

Concentration des ions orthophosphates dans les globules rouges humains

(1)

Auteurs	Conditions du prélèvement	µM de PO_4 /ml GR	P Total /ml GR	PO_4 en % du P Total	µg/ml GR
Bartlett G.R. (11)	héparine	0,280 - 0,480	11,480 - 16,250		355,9 - 503,8
Cartier P. (38)	ACD	0,660 - 1,550 moy. 1,050 ± 0,24	11,620	9,1	360,2 ± 31,1
	héparine	0,161 - 0,371 moy. 0,275 ± 7,47	—	< 2 %	
Gabrio B.W. (77) (79)	ACD	1,900 et 1,250	18,887		585,5
Gerlach E. (82)	citrate	0,09 - 0,345 moy. 0,225 ± 3,0	13,990	2,02	433,7
Gourley D. (89)	héparine	0,820 ± 5,0	17,741	7,9	550
Macho L. (148)	—	0,870	—		
Prankerd T.A.J. (188)	—	1,130 - 2,060		19,3	
Buell M.V. (34)	sg défibriné ou oxalaté	0,148 - 0,264	—		
Skaug O.E. (214)	héparine	≈ 0 (0,087/GR non lavés)			
Laity J.L.H. (138)	—		16,965		525,9
Rohdwald M. (204)		—	—		302,5 - 452,5

Nous résumerons simplement ici une série d'expériences que nous avons réalisées afin de préciser les causes de ces divergences :

1. **Le globule rouge contient normalement des ions PO_4^{---} :**

Bien qu'il soit difficile de prouver irréfutablement que le globule renferme *in vivo* des orthophosphates, nous avons tenté d'obtenir les globules dans un état aussi peu modifié que possible. Sur des chiens anesthésiés au chloralose *, un segment d'aorte abdominale a été prélevé entre deux ligatures et directement centrifugé à 0° : la séparation globules/plasma s'opère alors directement dans le vaisseau, sans contact avec l'air et sans l'introduction d'un anticoagulant... Le vaisseau est congelé dans l'azote liquide et le culot coupé, pesé et immédiatement déféqué par l'acide perchlorique. Les valeurs de P (PO_4) trouvées sont corrigées de la rétention plasmatique (calculée par la méthode d'EVANS (149) (71) à partir des colorations du plasma et du culot). Dans toutes les expériences, les valeurs de P (PO_4) trouvées sont du même ordre de grandeur que dans le prélèvement classique sur héparine.

2. **Quelle est la nature de l'artefact responsable des divergences ?**

a) Nous avons soumis des globules à des centrifugations à faible vitesse, pendant des durées variables, de manière, à obtenir des volumes de rétention plasmatique différents, sans léser la cellule. Cette rétention a été déterminée soit par le bleu EVANS, soit par la sérum-albumine marquée à l'iode 131. La teneur en P (PO_4) a été dosée sur le culot et sur le plasma surnageant, et la concentration intracellulaire calculée en tenant compte de la correction du plasma retenu.

Ces valeurs ont été comparées à celles qu'on obtient avec le même sang dont le culot globulaire avait été lavé deux fois par une solution isotonique de KCl refroidi.

Le lavage des globules rouges, réalisé dans de bonnes conditions (milieu isotonique refroidi, centrifugation du sang aussitôt prélevé et à faible vitesse, n'excédant par 1 500 g), ne modifie pas la concentration intracellulaire en P (PO_4).

b) D'ailleurs, ces conditions excluent la possibilité d'une hydrolyse de phosphodérivés labiles : nous avons vérifié, en suivant les progrès de cette hydrolyse en fonction du temps, sur du sang prélevé soit sur ACD, soit sur héparine et placé à la température du laboratoire, que l'enrichissement en PO_4 aux dépens des fractions organiques évolue lentement dans les deux heures qui suivent le prélèvement et n'explique aucunement l'importance des divergences relevées ;

---

* La répartition du P globulaire chez le chien est assez semblable à celle de l'homme, ce qui nous semble légitimer l'extension des conclusions de ces expériences au globule rouge humain.

c) C'est l'anticoagulant qui modifie l'équilibre des ions PO_4^{---} dans le globule rouge. Nous avons déjà constaté à propos de l'influence des divers anticoagulants (41) que certains d'entre eux modifiaient la perméabilité ou le métabolisme de l'hématie. En particulier, la comparaison de l'héparine et du mélange ACD montre que les valeurs du P (PO_4) sont très fortement supérieures à celle des autres anticoagulants (héparine, silicone et froid, EDTA, liquoïde). On peut donc affirmer que l'équilibre normal des ions PO_4^{---} dans le globule rouge est représenté par les valeurs les plus basses (et identiques) fournies par ces derniers anticoagulants *.

II. — LE COMPARTIMENT INTRACELLULAIRE ORGANIQUE

La description la plus complète du compartiment organique du P intracellulaire a été donnée par BARTLETT (11) à partir de séparations sur résines anioniques et en ce qui concerne plus spécialement la fraction nucléotidique par MANDEL et Coll. (151).

Toutefois, la plupart des auteurs se sont contentés de déterminer les fractions les plus significatives, à savoir :

— les nucléotides adényliques ;

— les hexoses diphosphates ;

— le 2-3-diphoglycérate.

Ces deux dernières fractions étant souvent exprimées globalement sous la dénomination de fraction « esters ».)

Nous avons rassemblé dans le tableau XV les principales données récentes sur la répartition de la fraction organique, et dans le tableau XVI nous exprimons les valeurs moyennes de nos déterminations, effectuées selon la technique décrite précédemment, sur des sangs humains normaux prélevés sur le mélange ACD et sur héparine.

---

* La fuite du CO^2 au cours du prélèvement modifie très faiblement l'équilibre des ions phosphates, le sang hépariné prélevé sous huile de paraffine fournissant des valeurs légèrement plus basses qu'au contact de l'air : en raison de la faible amplitude du phénomène, nous n'avons pas cru devoir introduire cette modification qui complique la technique.

TABLEAU XV

Esters et phosphodérivés de l'Adénosine des globules rouges humains normaux (exprimés en μ M de phosphodérivés/ml de G.R.)

Auteurs	Prélèvement	Technique	ATP	ADP	AMP	Nucléotides	2,3 DPG	1,6 GDP	1,6 DPF
Jorgensen S. (119)	ACD	Dos. enzym.	0,89	0,17	0,04	1,11			
Overgaard-Hansen K. (174)		— —	1,16	0,25	0,07	1,48			
Overgaard-Hansen K. (175)	héparine —	— —	1,18 - 1,32	0,20 - 0,22	0				
Jones N. et Robinson M. (118)	—	Résine éch. d'ions	0,63 - 1,16	0,12 - 0,25	0,03 - 0,05	0,78 - 1,46	1,90 - 4,20		
Prankerd T.A.J. (188)	—	Chromato. papier	0,28 - 0,88	0,19 - 0,40	—	0,47 - 1,28	1,9 - 2,9		
Gerlach E. (82)	citrate	— —	0,75	0,33	< 0,11	1,19	4,07		0,47
Rohdewald M. (204)	liquemine	— —	0,7 - 1,4 moy.=1,0	0			1,8 - 3,3 moy.=2,1		
Whittam R. (242)	héparine	— —	0,5 - 1,2 moy.=0,9	0,4 - 0,6 moy.=0,48			3,3 - 5,4 moy.=4,62		
Rapoport S. (195)	—	Hydrolyse différent.	1,4				4,5		
Gourley D. (89)	—	— —	1,1	0			3,7		
Bartlett G.R. (11)	—	Résine éch. d'ions	0,9 - 1,23	0,19 - 0,25	0,01 - 0,02	1,10 - 1,50	3,6 - 5,1	0,19 - 0,24	0,06 - 0,12
Mills G.C., Summers L.B. (158)	—	— —	0,51 - 0,55	0,07 - 0,12	0,01 - 0,02	0,59 - 0,69	1,55 - 1,99		
Mandel P. Chambon P. (151)	—	— —	0,82	0,14	0,02	0,98			
Yoshikawa H. (251)	— ACD	— — — —	1,03 - 1,20 1,07	0,06 - 0,13 0,20	⩽ 0,01 0,06	1,11 1,33	3,97 5		
Bishop C. (20)	héparine	— —	0,97	0,11	0,01	1,09			

TABLEAU XVI

Répartition des composés phosphorés acido-solubles du G.R. de sang humain prélevé sur A.C.D. et sur Héparine

	P (PO_4)	P Esters	P (ATP)	P (ADP)	P (AMP)	P Nucléotides	P total
Sur ACD :							
en µg/ml G.R.	32,7	246,3	63,6	19,6	3,1	86,3	365,3
±	7,4	27,6	9,3	2,8	0,8	9,0	
en µMol. P/ml G.R.	1,05	7,95	2,05	0,63	0,10	2,78	11,78
±	0,24	0,89	0,30	0,09	0,03	0,29	
en µMol. Phº dérivés (N.B.)	1,05	3,98	0,68	0,31	0,10	1,09	
±	0,24	0,45	0,10	0,05	0,03	0,07	
Sur Héparine :							
en µg/ml G.R.	10,1	256	72,5	18,6	2,2	93,3	359,4
±	2,6	32	8,4	3,7	0,6	7,6	
en µMol. P/ml G.R.	0,33	8,25	2,34	0,60	0,07	3,01	11,59
±	0,08	,03	0,27	0,12	0,02	0,28	
en µMol. Phº dérivés (N.B.)	0,33	4,12	0,78	0,30	0,07	1,15	5,60
±	0,08	0,52	0,09	0,06	0,02	0,07	

N.B. — Les concentrations en esters sont exprimées ici en 2-3 DPG qui représente le constituant le plus abondant de cette fraction.

CHAPITRE II

LA CINÉTIQUE DE L'ENTRÉE DES IONS ORTHOPHOSPHATES

I. — CINETIQUE EN FONCTION DE LA DUREE D'INCUBATION

Nous étudierons séparément la cinétique de l'incorporation globale du ^{32}P, et celle de la répartition dans les diverses fractions phosphorées intracellulaires.

A) La cinétique globale : PO_4 (E) ——— PO_4 (I)

La courbe 14 traduit la cinétique de la pénétration des ions PO_4^{---} (E) dans le globule : le phénomène, régulier et très reproductible, tend vers un équilibre que l'on peut considérer comme atteint pratiquement au bout de deux heures *. Cette entrée de PO_4 dans la cellule correspond à une réaction d'ordre 1 : la vitesse décroît en fonction du temps, et elle est à chaque instant proportionnelle à la concentration de PO_4 (E) restant. La constante de vitesse K est définie par la relation classique :

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

où : t représente le temps exprimé en minutes

x le pourcentage de $^{32}PO_4$ qui pénètre dans la cellule pendant le temps t

a—x le pourcentage de $^{32}PO_4$ qui reste au temps t dans le milieu extracellulaire.

Cette disparition de la radioactivité du milieu extracellulaire, d'allure exponentielle, se traduit par une droite en coordonnées semi-logarithmiques. A partir de cette droite, nous pouvons exprimer la vitesse de pénétration des ions PO_4^{---} dans la cellule. La notion de temps de demi-renouvellement (T 1/2) traduit le temps nécessaire (exprimé en minutes) pour que la concen-

---

* Nous avons vérifié cette affirmation sur des expériences de plus longue durée. Nous avons renoncé à dépasser le temps de deux heures, car « in vitro », à 37°, le globule rouge s'altère rapidement après la troisième heure (en particulier, hémolyse).

Pour Vestergaard Bogind (234), l'équilibre serait atteint en 3 heures.

Pour Iversen (116), à partir de la 2e heure.

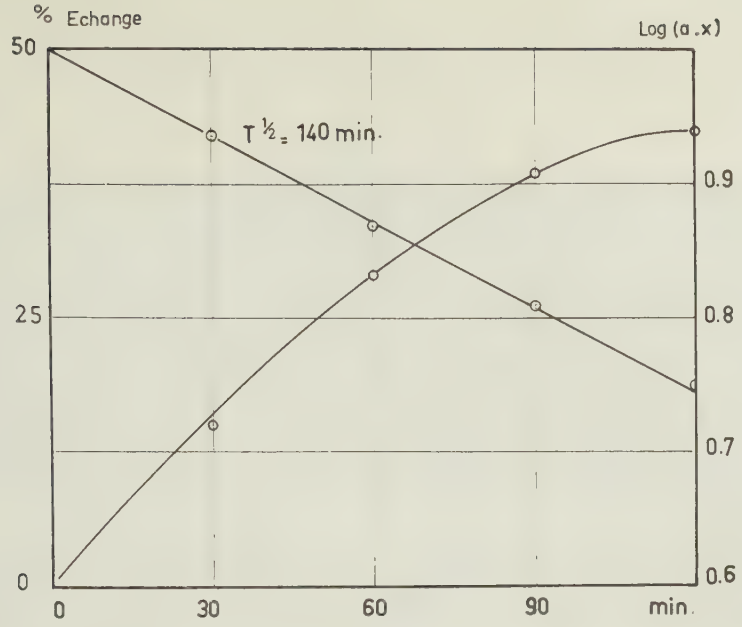


FIG. 14
Cinétique en fonction de la durée d'incubation de l'échange global du ^{32}P extracellulaire

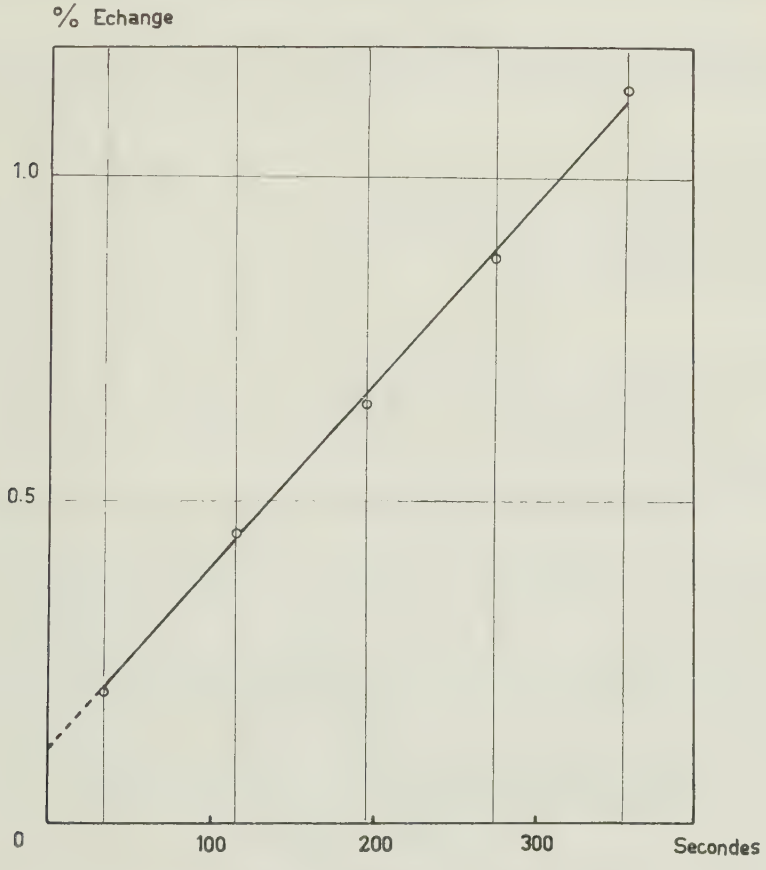


FIG. 15
Cinétique de l'incorporation globale du ^{32}P dans le globule rouge (temps courts)

tration en ^{32}P (E) soit la moitié de la concentration initiale *. Dans la figure 14, le T 1/2 est d'environ 140 minutes (sang recueilli sur héparine reconstitué avec KCl isotonique en hématocrite 50 et incubé à 37°.)

La phase initiale d'incorporation a été étudiée sur des incubations de très courtes durées : les orthophosphates marqués pénètrent instantanément dans la cellule (fig. 15). Dans un intervalle de temps très restreint, (0 à 5 minutes) le phénomène se traduit par une droite. Il est à souligner que cette droite ne passe pas par l'origine : extrapolée à l'instant zéro, une certaine radioactivité paraît déjà fixée sur le globule. Ce phénomène, sur lequel nous reviendrons plus loin, correspond soit à un artéfact (traces de milieu extracellulaire résiduel), soit à une adsorption à la surface des globules.

A partir des cinétiques d'incorporation globale du P (E) de courtes durées, il est possible de déterminer directement le pourcentage de renouvellement et de déduire, par le calcul, T 1/2 et vie moyenne. Les valeurs du tableau ci-dessous (XVII) confirment celles de l'extrapolation graphique de T 1/2, sur des durées d'incubation prolongées.

TABLEAU XVII

Vitesse de pénétration des ions PO_4 dans le globule rouge humain

Durée d'incubation	T 1/2	Vie moyenne	% renouvellement
0 - 120 mn (Plasma)	124 mn	179 mn	0,56
0 - 120 mn (KCl)	132 mn	190 mn	0,53
0 - 200 mn (KCl)	133 mn	192 mn	0,52

Le T 1/2, la vie moyenne et le pourcentage de renouvellement ont été calculés à partir des représentations semi-logarithmiques de la décroissance du ^{32}P (E).

Les valeurs soulignées ont été déterminées directement sur la courbe, les autres étant calculées à partir d'elles.

Quelques remarques s'imposent :

Ces valeurs, qui traduisent la vitesse de pénétration des ions PO_4^{---} extracellulaires dans le globule, sont différentes de celles de GOURLEY (91)

* La durée de vie (T 1/2) du P extracellulaire, qui traduit une décroissance de 50 pour cent du ^{32}P (E), est déduite graphiquement de la courbe de décroissance du ^{32}P (E) représentée en coordonnées semi-logarithmiques.

La vitesse de renouvellement (Vr) est calculée à partir de la durée de demi-vie, selon la relation :

$$Vr = 0{,}693/T\ 1/2$$

La durée de vie moyenne, qui correspond au renouvellement de la totalité du P (E) est déduite de la durée de demi-vie :

$$\text{Vie moyenne} : T\ 1/2 \times 1{,}44$$

(T 1/2 = 280 minutes) et de WHITTAM (243) (T 1/2 = 180 minutes) : elles concordent avec celles de MOLLISON (160) (T 1/2 = 145 minutes).

D'autre part, GOURLEY (91) utilisant du sang humain, souligne l'existence d'une discontinuité de la droite obtenue en représentation semi-logarithmique, traduisant deux processus d'incorporation :

— l'un très rapide (T 1/2 = 8 minutes) qui correspondrait à une adsorption en surface de la membrane ;

— l'autre plus lent (T 1/2 = 280 minutes) traduisant la diffusion.

Nous avons particulièrement exploré la phase rapide signalée par GOURLEY : jamais nous n'avons constaté (en incubation plasmatique) de discontinuité dans la courbe de disparition du ^{32}P (E), qui demeure linéaire pendant toute la durée des expériences (10 secondes à 2 heures). Nous verrons d'ailleurs que ce fait n'exclut pas l'existence d'un phénomène d'adsorption pratiquement instantanée, qui n'entraîne pas d'accident sur la courbe.

B. **La répartition intracellulaire du ^{32}P :**

La constance de concentration intracellulaire des orthophosphates et des phosphodérivés organiques pendant des temps d'incubation relativement courts reflète l'équilibre dynamique entre le processus d'entrée et celui d'incorporation dans les dérivés de la glycolyse.

La comparaison, en fonction du temps, des activités spécifiques d'une série de dérivés dont on sait qu'ils participent à la même séquence métabolique est un moyen classique pour déterminer l'ordre des intermédiaires. Appliquée au problème de la perméabilité des globules rouges aux ions PO_4^{---}, cette méthode doit nous renseigner sur le mécanisme de l'entrée des ions.

— Si PO^{---}_4 pénètre par diffusion, l'activité spécifique de la fraction minérale est immédiatement la plus élevée, supérieure à celle des fractions organiques marquées secondairement.

— Si, au contraire, l'entrée est liée à une réaction métabolique, le phosphodérivé de la glycolyse apparu le premier, a l'activité spécifique la plus haute.

En somme, ces divers composés étant séparés, la mesure rigoureuse de leur activité spécifique nous donne — en principe — le moyen de préciser le processus d'entrée des ions PO_4^{---}.

En réalité, les phénomènes dont nous cherchons à déterminer quel est celui qui précède l'autre, résultent d'un double équilibre rapidement établi entre les trois compartiments :

$$P\ (E) \rightleftharpoons PO_4\ (I) \rightleftharpoons P\ (org.)$$

La cinétique de l'incorporation du ^{32}P dans les diverses fractions

intracellulaires, déterminée sur des durées d'incubation de l'ordre de 1 à 2 heures, indique l'allure générale du phénomène. Mais, seules, de très courtes durées d'incubation (inférieures à 3 minutes), permettent d'observer l'ordre dans lequel s'opère le marquage.

1. **Les incubations prolongées (0 à 120 minutes) :**

Malgré les réserves précédentes, ces expériences nous permettent déjà quelques conclusions :

TABLEAU XVIII

Activité spécifique des diverses fractions intraglobulaires (incubation KCl/37°)

	30 minutes	60 minutes
PO_4	2 380	3 260
ATP	1 632	2 310
ADP	1 716	2 520
G-6-P	328	840
F-1-6-P	1 120	2 160
2-3-DPG	542	1 100

— la fraction dans laquelle l'incorporation est la moins rapide est représentée par les esters phosphoriques, leur activité s'élève lentement et l'équilibre avec les autres compartiments n'est jamais atteint dans les limites de durées d'incubation de 2 heures.

Il serait toutefois imprudent d'en déduire que les esters ne sont pas marqués précocement. Certes, cette fraction est constituée pour plus de 90 pour cent par le 2-3 DPG, mais elle est très hétérogène et certains phosphodérivés en C^3 ou en C^6 — figurant pour une faible part dans la répartition des esters — peuvent fort bien incorporer très rapidement et intensément le ^{32}P.

Nous avons séparé les divers constituants de cette fraction par chromatographie sur papier selon GERLACH, et par chromatographie sur DOWEX selon BARTLETT : aucun des intermédiaires de la glycolyse participant à cette fraction « esters » ne se marque intensément et rapidement (tableau XVIII).

— Les activités spécifiques des dérivés adényliques ATP et ADP, rapportées aux P actifs, sont très voisines. Nous devons souligner que l'activité spécifique de l'ADP est presque constamment supérieure celle de l'ATP. La mesure séparée des activités spécifiques des P β de l'ADP, des P β et γ de l'ATP, après séparation chromatographique selon TSUBOI (230) montre que le P β de l'ATP et de l'ADP est plus fortement marqué que le P γ de l'ATP (tableau XIX). Le P α de l'AMP, par contre, n'incorpore que très lentement le ^{32}P : son activité spécifique demeure du même ordre de grandeur que celle des esters phosphoriques *.

TABLEAU XIX

Activité spécifique des P α, β, γ, des nucléotides adényliques

	AMP	ADP	ATP
P α	146	153	149
P β.....		1 256	1 205
P γ.....			988

— L'activité spécifique de la fraction (orthophosphates) est toujours supérieure à celle des fractions organiques.

2. **Les incubations de courte durée (0 à 300 secondes) :**

C'est dans les expériences de courte durée qu'il nous est possible de suivre l'entrée des ions PO_4^{---} dans le globule et leur incorporation dans les fractions organiques. Dans ce domaine, nous avons réalisé de nombreuses expériences avec des temps d'incubation compris entre 20 secondes et 80 secondes : leurs résultats sont concordants. L'une de celle-ci est résumée dans les figures 16 et 17. Il est évident que dans des limites d'incubation aussi restreintes, les concentrations ne varient certainement pas ; nous l'avons d'ailleurs vérifié, puisque nous devions doser chaque fraction pour

* Deux explications à ce marquage de l'AMP sont possibles :
— soit une phosphorylation de l'adénosine par l'ATP sous l'influence d'une adénosine kinase,
— soit plus vraisemblablement par une voie plus complexe proposée par PREISS et HANDLER (189), faisant intervenir la séquence :

Adénosine... Inosine $(^{32}PO_4)$ R-I-•P (ATP) •P R P P (Adénine) AM •P

en exprimer l'activité spécifique : seule cette activité spécifique nous intéresse ici. Les résultats sont particulièrement démonstratifs :

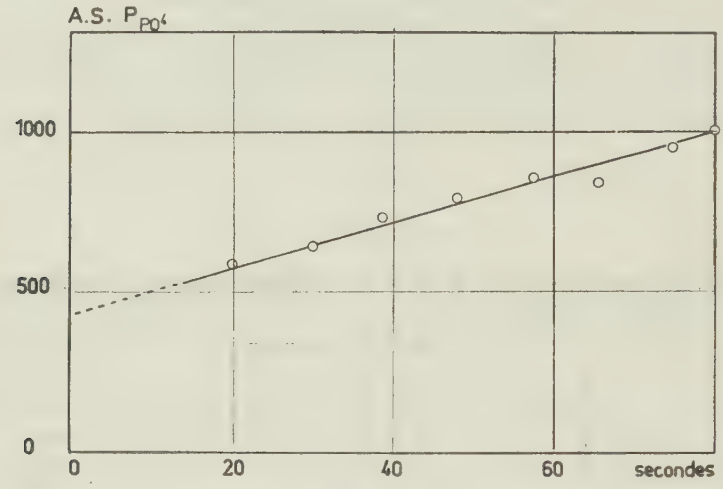


FIG. 16
Variations de l'activité spécifique du P (PO_4) intracellulaire (incubation KCl iso/37°)

— La fraction « orthophosphates » présente d'emblée l'activité spécifique la plus élevée, bien plus grande que celle des fractions « P organiques », ce qui semble exclure que l'entrée des ions PO_4^{---} dans la cellule puisse se faire par l'intermédiaire d'un phosphodérivé de la glycolyse : seule, une diffusion directe serait en accord avec les courbes.

Soulignons que nous retrouvons dans ces expériences de temps courts ce que nous avions noté en étudiant l'échange global. La courbe traduisant la cinétique de l'incorporation dans la fraction PO_4 ne passe pas par l'origine, alors que celles des autres fractions passent toutes par le point zéro (fig 18) : dès l'introduction du ^{32}P dans le milieu extracellulaire, le globule rouge fixe une certaine radioactivité, retrouvée dans la fraction orthophosphates, ce qui évoque un processus d'adsorption au niveau de la membrane. Nous en discuterons plus loin.

— La fraction esters incorpore très lentement. Nous n'avons figuré sur la courbe que les variations du 2-3 DPG. Mais les autres phosphodérivés glucidiques que nous avons séparés selon la technique de GERLACH (82), ont une activité spécifique très inférieure non seulement à celle de PO^4, mais également à celles de l'ATP et de l'ADP.

— Dans la fraction des nucléotides adényliques, l'ATP et l'ADP incorporent rapidement le ^{32}P. La courbe 17 traduit bien le balancement qui s'établit dès le début de l'incorporation entre les deux nucléotides,

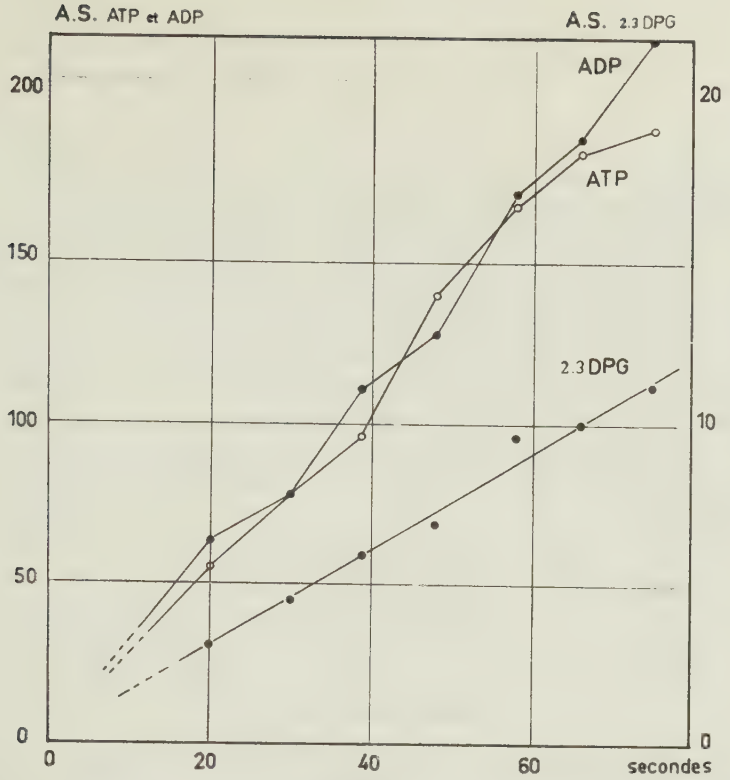


FIG. 17
Variations de l'activité spécifique des fractions phosphorées organiques intracellulaires
(incubation KCl iso/37°)

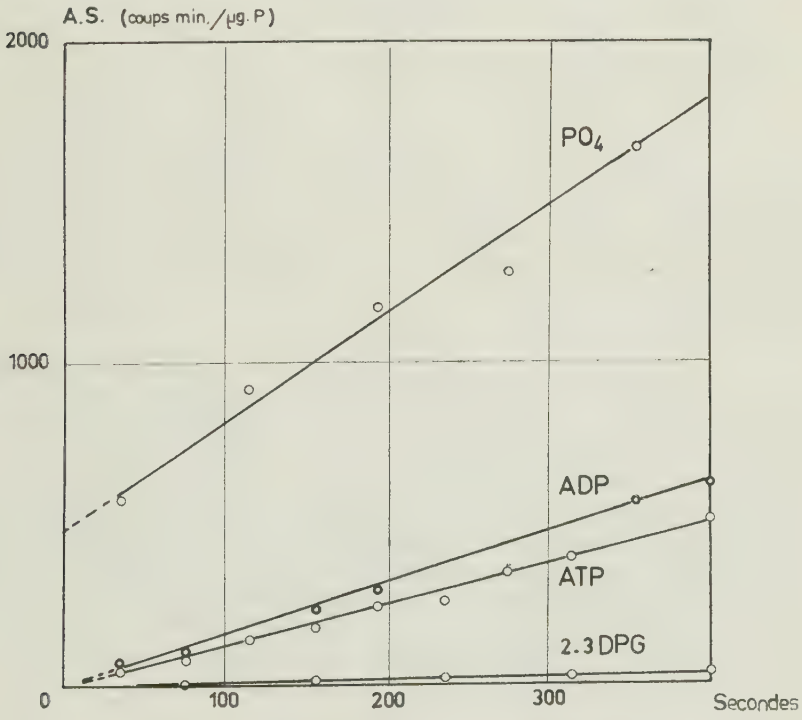


FIG. 18
Cinétique de l'incorporation du $^{32}PO_4$ extracellulaire dans les principales fractions phosphoriques intraglobulaires
(temps courts)

et que nous retrouvons dans les incubations de longue durée. La très forte activité de l'adénylate kinase, qui catalyse la réaction :

$$2\ ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$$

pourrait rendre compte de la rapidité du marquage de l'ADP. Mais il est possible qu'un mécanisme différent, non encore élucidé, intervienne *.

L'interprétation de la cinétique de la répartition intracellulaire du ^{32}P est aisée : elle correspond au cycle classique du phosphore dans la glycolyse d'EMBDEN-MEYERHOF.

— En l'absence de glycogénolyse, le radiophosphore des ions PO_4^{---} ne peut entrer dans la voie glycolytique qu'au niveau de l'oxydation du triosephosphate :

Phospho-3-Glycéraldéhyde

$^{32}PO_4$ ..... ↓

Acide 1-3 diphosphoglycérique

ADP ..... ↓ ..... ATP ($^{32}P\ \gamma$)

Acide 3 Phosphoglycérique

et le ^{32}P apparaît alors dans le $P\gamma$ de l'ATP, ensuite — par action de l'adénylkinase — dans le P β de l'ADP, puis de l'ATP.

Le marquage des esters a lieu à partir du ^{32}P de l'ATP :

— soit dans la réaction hexokinasique :

Glucose + AT•P ——— Glucose-6•-P + ADP

— soit dans la réaction phosphofructokinasique :

Fructose 6 phosphate + AT•P ——— Fructose-•1-6 diP + ADP

— Le 2-3 DPG, provenant de l'acide 1-3 diphosphoglycérique (dont le ^{32}P se déplace de 1 en 2 sous l'influence d'une PhºMutase) se marque donc en 2, mais dans la seule mesure où le 1-3 DPG échappe à la réaction qui lie la recharge de l'ATP à l'oxydation du triosophosphate. D'après la cinétique de l'entrée du ^{32}P dans les diverses fractions, la vitesse de renouvellement du 2-3 DPG est plus lente que celle des nucléotides adényliques et des autres esters.

La comparaison des activités spécifiques fait ressortir l'impossibilité de considérer une fraction organique comme précurseur du PO_4 intracellulaire : ce qui devrait nous inciter à conclure que ces ions PO_4^{---} pénètrent dans le globule rouge par diffusion, comme les autres anions, et que leur entrée dans la cellule précède leur incorporation dans les dérivés organiques associés à la glycolyse. De telles conclusions tirées des expériences précédentes, seraient critiquables. Ne pas identifier de fraction organique plus précocement marquée que la fraction minérale intracellulaire ne signifie nullement qu'elle n'existe pas ! On peut concevoir que PO_4 (E) forme une

* Ce point est actuellement à l'étude.

combinaison au niveau de la membrane (donc fortement marquée) et que ce phosphodérivé se déphosphoryle en libérant PO_4 (I), avant toute dilution dans le contenu intracellulaire. Pour que la cinétique que nous venons d'établir puisse être interprétée comme traduisant une diffusion, nous devons démontrer qu'il ne se forme pas une telle combinaison au niveau de la membrane. Autrement dit, il faut éliminer la possibilité :

— soit d'une diffusion facilitée, par l'oscillation d'un transporteur entre les deux faces de la membrane ;

— soit d'un transport actif, associé à la glycolyse.

Tels sont les points que nous nous proposons de développer au chapitre suivant.

II. — CINÉTIQUE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

Les travaux les plus anciens, où le marquage isotopique a été utilisé (100) (69) soulignent l'absence de pénétration des ions PO_4^{---} à 0°C : pratiquement, tout échange est supprimé au-dessous de 15° C (87).

La perméabilité augmente avec la température d'incubation (fig. 19 et 20).

Dans de nombreuses expériences, nous avons déterminé le pourcentage global à 30° C et 40° C, et établi la constante de vitesse. A partir des données cinétiques, il est possible de calculer le coefficient de température (Q 10) et l'énergie d'activation EA du phénomène par différentes formules dérivées de l'équation d'ARRHENIUS :

— soit à partir des constantes de vitesse K_1 et K_2 aux deux températures T_1 et T_2

$$E = \frac{d\ (\log K) \times 4{,}57}{d\left(\frac{1}{T}\right)}$$

— soit à partir du Q_{10}

$$E = \frac{R\ T^2\ \mathrm{Log}\ Q_{10}}{10}$$

ou en transformant en logarithmes décimaux

$$E = \frac{2{,}303\ R\ T^2 \log Q_{10}}{10}$$

L'énergie d'activation de la migration dans l'intérieur de la cellule des ions PO_4^{---}, varie singulièrement selon la nature du milieu d'incubation. Les valeurs obtenues avec le plasma sanguin ou avec une solution isotonique de KCl sont du même ordre de grandeur. Légèrement supérieures à celles que donnent PRANKERD (188) (19800) et GOURLEY (87) (16700). Elles se situent aux environs de 21 000 calories/moles (tableau XX).

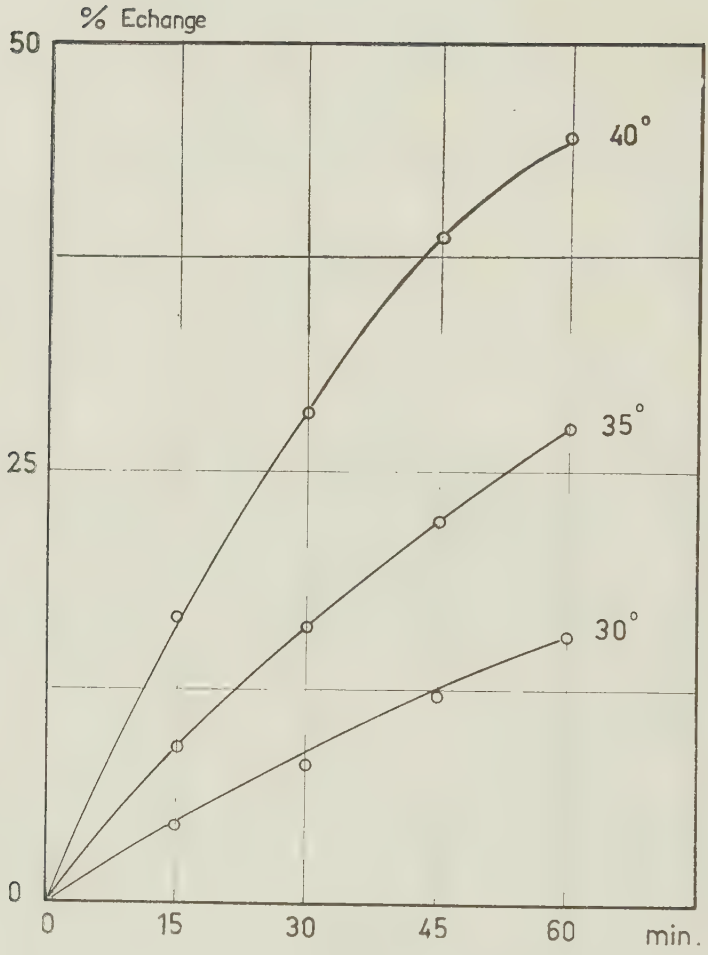


FIG. 19

Cinétique de l'échange global du ^{32}P extracellulaire en fonction de la température d'incubation

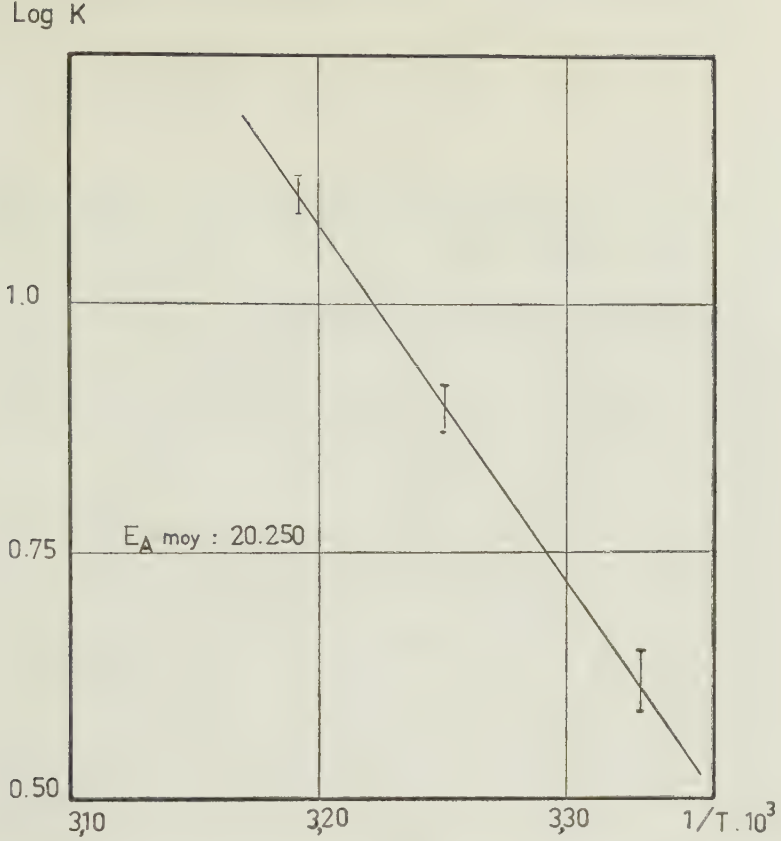


FIG. 20
Effet de la température sur la vitesse maximum d'incorporation du $^{32}PO_4$ extracellulaire
(en présence de plasma, H = 50)

TABLEAU XX
Energie d'activation de l'entrée du ^{32}P extracellulaire, dans divers milieux d'incubation
(calculées dans l'intervalle de température 30/40°)

Milieu d'incubation		Energie d'activation (moyenne)	±
Plasma			
PL —— GR	(8)	21 700	2 000
GR —— PL	(2)	19 200	(20 200-18 200)
KCl	(8)	20 200	1 850
NaCl	(6)	8 500	1 100
Krebs/PO_4	(2)	20 350	(19 500-21 200)
Krebs/CO_3H	(2)	17 250	(17 700-16 800)

L'énergie d'activation est très nettement abaissée lorsque le milieu d'incubation est constitué par une solution isotonique de NaCl : elle est alors inférieure à 10 000 calories.

Il est vraisemblable que l'échange des ions PO_4^{---} est influencé par les phénomènes de transport actif qui excluent l'ion sodium de la cellule : nous avons déjà souligné précédemment les différences de cinétique lorsque l'incubation est réalisée en NaCl isotonique. C'est précisément la similitude de comportement des globules en plasma vrai et en KCl isotonique qui nous a fait opter pour ce dernier milieu.

Nous avons également déterminé le coefficient de température de l'incorporation du ^{32}P dans les fractions organiques intracellulaires. Les valeurs obtenues (ATP = 2,0, ADP = 2,2, esters = 4,2, PO_4 = 2,3) sont en accord avec celle de GERLACH (82), qui observe également un Q_{10} très élevé pour le marquage du 2-3 DPG sans que l'on puisse l'expliquer. Peut-être convient-il de rapprocher des chiffres ci-dessus l'observation faite par RACKER (192) : celui-ci attribue à l'utilisation du glucose par le globule rouge un Q_{10} de 2,2, valeur proche de celle du Q_{10} de l'ATP et de l'ADP (dont on connaît le rôle régulateur dans la glycolyse).

Il est classique d'attribuer aux phénomènes de diffusion une énergie d'activation basse, inférieure à 10 000 calories-mole, et les phénomènes de transport actif seraient au contraire caractérisés par une énergie d'activation élevée. En réalité, cette distinction n'est pas aussi tranchée, et de nombreux auteurs ont souligné de multiples exceptions à cette règle. Pour le cas du globule, il semble impossible que cela puisse permettre le choix du mécanisme de transport : La température d'incubation, tout en modifiant la vitesse de la réaction de perméabilité, modifie également la structure de la membrane et de ce fait, la perméabilité. D'ailleurs, nous connaissons deux exceptions à la règle précédente :

— la composante passive du flux de sodium à travers la membrane présente une énergie d'activation aussi élevée que la composante active du même transport (GLYNN (84)).

— l'énergie d'activation du transport des ions SO_4^{--} est élevée, de l'ordre de 23 à 30 000 (182). Et cependant, il est hors de doute que ces ions pénètrent dans la cellule par diffusion passive (202).

CHAPITRE III

LE MÉCANISME DE L'ENTRÉE DES IONS ORTHOPHOSPHATES

Si l'analyse de la cinétique de pénétration des ions PO_4^{---} extracellulaires dans le globule rouge fournit des arguments en faveur d'une diffusion passive, il n'est pas possible sur ces seules données d'exclure la participation d'une combinaison transitoire au niveau de la membrane ; on aurait alors :

— une diffusion facilitée ;

— ou un transport actif.

Nous devons examiner ces deux hypothèses. La pénétration d'une substance à travers une membrane vivante, selon l'un ou l'autre de ces processus, répond à des lois précises plus complexes que dans le cas d'une simple diffusion passive : nous les rappellerons d'abord dans leurs grandes lignes.

I. — LA DIFFUSION FACILITÉE

Rappelons que dans la diffusion facilitée, le transport est lié à la formation préalable d'une combinaison entre la substance S et un site transporteur de la membrane, Tr, combinaison qui évoque celle de la catalyse enzymatique, c'est-à-dire la combinaison (Enzyme-Substrat)

Il est possible de traduire la plus ou moins grande affinité du transporteur pour la substance transportée par une relation du type MICHAELIS-MENTEN, et de mesurer une constante analogue au Km des enzymes (par exemple, à partir d'une représentation graphique selon LINEWEAVER et BURK).

Pour déceler l'existence d'un processus de diffusion facilitée, nous devons analyser l'influence sur la pénétration des ions PO_4^{---} extracellulaires:

— de concentrations croissantes de PO_4 (E)

Pour démontrer un effet de saturation éventuel du site transporteur : la traduction graphique selon LINEWEAVER-BURK nous indique le degré d'affinité du site transporteur pour la substance transportée.

— de substances de structure apparentée

tels les ions SO_4^{--} et surtout ASO_4^{---} ; ils sont susceptibles d'entrer en compétition avec le site actif et de ralentir l'entrée des ions PO_4^{---} (E).

A. L'EFFET DE SATURATION

Nous avons étudié l'influence de la concentration extracellulaire en PO_4^{---} sur la cinétique de l'entrée dans la cellule. Nous avons choisi une gamme de concentration étendue, comprise entre 0 et 300 γ de P (PO_4) par ml de milieu KCl isotonique (soit de 0 à 10 μmoles environ par ml)*

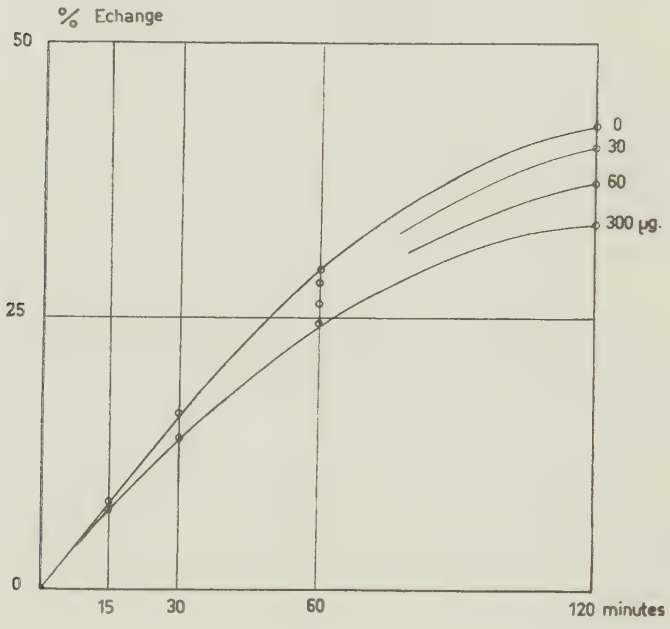


FIG. 21

Influence de la concentration plasmatique en PO_4 sur le pourcentage d'échange

---

* Nous n'avons pas dépassé cette limite supérieure de 10 μ moles environ par ml, qui correspond déjà à une concentration dix fois supérieure à celle d'un plasma normal. L'exploration du domaine des très fortes concentrations comme celles qu'a réalisées VESTERGAARD BOGIND (233) (234), nous paraît compliquer le problème en introduisant une variable aussi éloignée des conditions physiologiques. Il a été observé avec les ions SO_4^{--} que les lois de la diffusion simple cessaient de s'appliquer lorsque la concentration plasmatique en SO_4^{--} dépasse 10 μ M/ml (185). D'ailleurs, les concentrations élevées de PO_4^{---} — supérieures à 930 γ par ml, selon CHAPMAN (44) — inhibent la glycolyse et CHRISTENSEN (47) a signalé que le comportement de la membrane est très différent lorsqu'on atteint des concentrations élevées (de l'ordre de 3 mg/ml).

I. **Incubation de longue durée** (de 0 à 120 minutes)

La figure 21 traduit les variations du pourcentage d'échange en fonction de la concentration extracellulaire en P (PO_4) : ce pourcentage diminue nettement quand la concentration s'élève. En 120' à 37° il passe de 42,8 % en l'absence de P (E) à 33,6 % pour une concentration de 300 γ/ml.

Dans ces expériences, où la concentration en P (E) est connue, nous pouvons exprimer l'entrée des ions PO_4^{---} dans la cellule en γ de P (E) ayant traversé la membrane. La variation en fonction de la durée d'incubation est représentée dans la figure 22 : elle montre que la quantité de P (E) pénétrant dans la cellule croît avec la concentration extracellulaire.

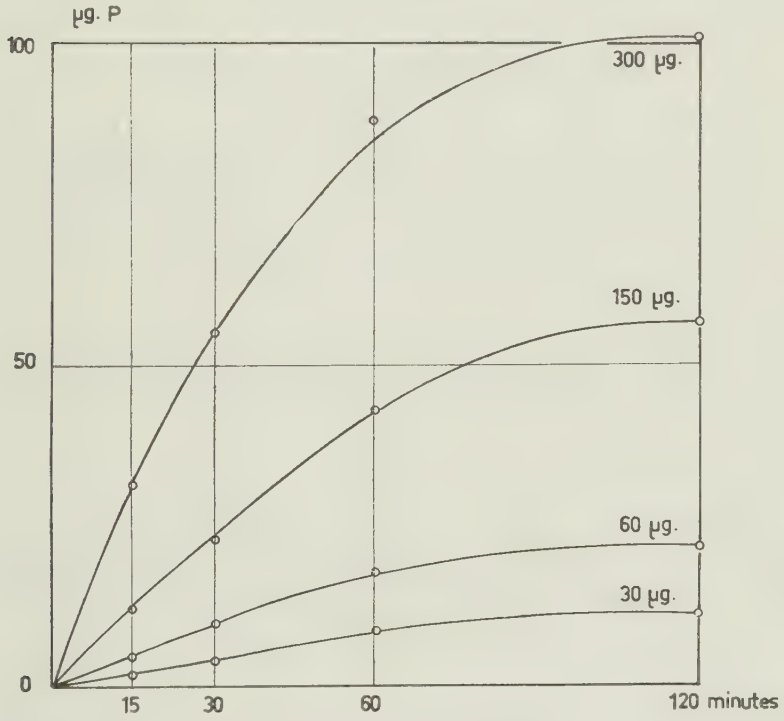


FIG. 22

Cinétique de l'incorporation globale du ^{32}P dans le globule rouge, en fonction de la concentration en PO_4 extracellulaire

(en ordonnées, µ g de P ayant pénétré dans le globule rouge)

2. **Incubations de courte durée** (0 à 300 secondes).

Pour les raisons que nous avons déjà développées, l'analyse de la perméabilité dans des conditions de très courtes incubations traduit encore plus clairement le mécanisme d'entrée des ions PO_4^{---}. Ici on voit encore plus nettement que la cinétique d'incorporation globale n'est pas influencée par la concentration extracellulaire en ions PO_4^{---}. Les figures 23 et 24 traduisent la cinétique de cette phase initiale pour des concentrations (exprimées en P) de 10 γ et de 150 γ par ml. Exprimé en valeur absolue, c'est-à-dire en γ de P (E) ayant traversé la membrane en un temps donné, le flux est proportionnel à la concentration extracellulaire. Par contre, si nous l'exprimons en pourcentage de la concentration en P (E), la fraction qui a traversé la membrane est exactement la même, que la concentration du milieu extérieur soit faible ou élevée.

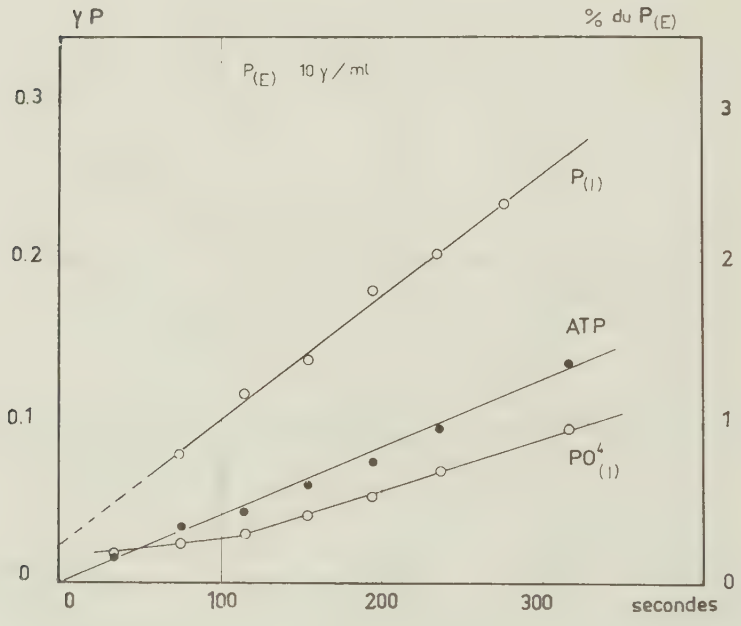


FIG. 23

Incorporation du ^{32}P extracellulaire dans P total (I), P (PO_4) I et P ATP, exprimée en microgramme de P et en pourcentage du P extracellulaire
(Incubation KCl iso + 150 γ P (PO_4)/37°)

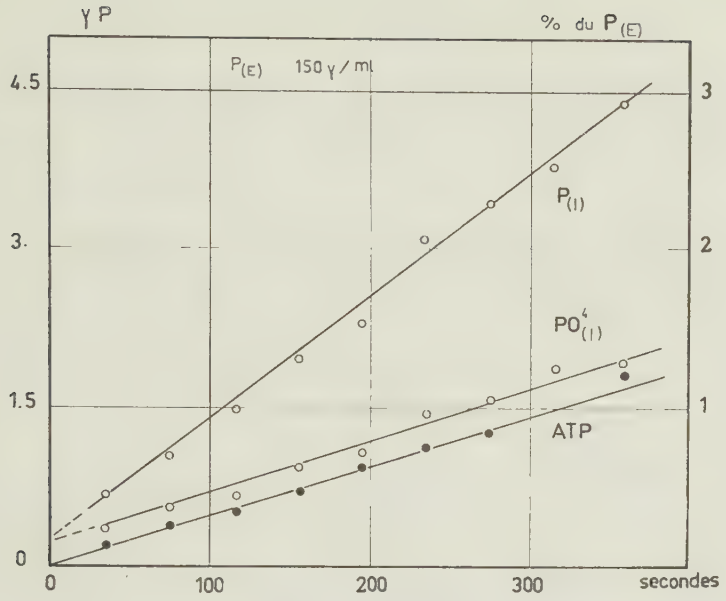


FIG. 24

Incorporation du ^{32}P extracellulaire dans P total (I), P (PO_4) I et P ATP, exprimée en microgramme de P et en pourcentage du P extracellulaire
(Incubation KCl iso + 10 γ P (PO_4)/37°)

En réalité, ces deux expressions cinétiques ne permettent pas de déceler un effet de saturation d'un site transporteur éventuel. Pour mettre en évidence un tel effet, nous devons analyser différemment l'influence de concentrations croissantes en PO_4 (E) sur l'entrée dans la cellule.

Deux représentations graphiques conduisent à la même interprétation :

— Si on figure — pour une durée d'incubation donnée — l'entrée des ions PO_4^{---} en fonction de la concentration du milieu extracellulaire en P (PO_4), la saturation d'un site actif se traduit par une inflexion de la courbe aux concentrations élevées (qui tend asymptotiquement vers l'horizontale).

— Si on utilise la représentation proposée par LINEWEAVER et BURK pour exprimer en enzymologie l'affinité de l'enzyme pour le substrat (ici, l'affinité du site actif pour l'ion PO_4^{---}) la droite obtenue en figurant les variations de 1/S en fonction de 1/V coupe l'axe des abscisses

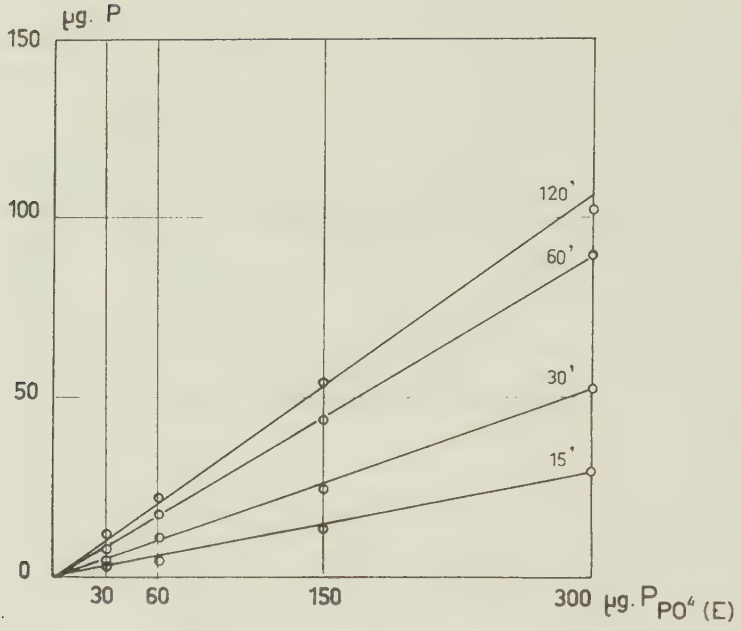


FIG. 25

Influence de la concentration en PO_4 extracellulaire sur l'incorporation globale du ^{32}P dans le globule rouge
(en ordonnées γ g de P ayant pénétré dans la cellule)

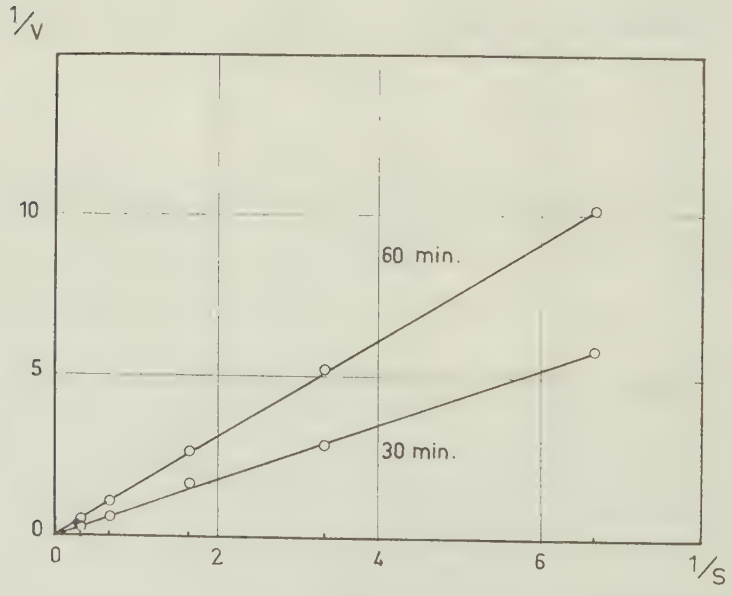


FIG. 26

Influence de la concentration en PO_4 du milieu extracellulaire sur l'entrée des ions PO_4^{---} dans le globule rouge
(selon la représentation de LINEWEAVER-BURK)

pour une valeur qui correspond à 1/Km, ce qui permet de calculer une constante de MICHAELIS et d'exprimer par une notion quantitative l'affinité du site actif pour la substance S.*

a) **Première représentation** : exprimons la cinétique en suivant l'entrée des ions PO_4^{---} (E) en fonction de la concentration du milieu externe (figure 25) : la quantité de P (E) qui a traversé la membrane en un temps d'incubation donné, est une fonction linéaire de la concentration extracellulaire en ions PO_4^{---}.

Dans les limites de concentration envisagées (0 à 10 µmoles environ de P (E) par ml), non seulement un effet de saturation n'apparaît pas, mais en outre la relation étroitement linéaire entre le flux de PO_4^{---} et le gradient de potentiel électrochimique caractérise un processus de diffusion passive, défini par la loi de FINCK.

b) **Représentation de LINEWEAVER-BURK :**

Les difficultés techniques de cette représentation sont classiques. Le nombre important de déterminations que nous avons effectuées nous permet cette traduction avec une bonne précision. Exprimée en figurant les variations de 1/S en fonction de 1/V, l'influence de la concentration externe en ions PO_4^{---} se traduit par une droite. Et si on représente, comme sur la figure 26 le phénomène à des temps différents d'incubation, on obtient naturellement un faisceau de droites qui passent par l'origine.

Ce qui signifie que 1/Km est nul : autrement dit que la constante d'affinité du site actif éventuel pour les ions PO_4^{---} est nulle. Plus simplement : l'entrée des ions PO_4^{---} dans le globule rouge correspond dans ces expériences à une cinétique de diffusion passive et ne met pas en jeu un site actif au niveau de la membrane.

Il est d'ailleurs possible, à partir des valeurs des courbes, de calculer cette vitesse de pénétration en pourcentage de renouvellement du P (E) (Cf. page 76) : elle est respectivement de 0,52 pour cent par minute (pour P (E) = 10 γ/ml), et de 0,50 pour cent par minute (pour P (E) = 150 γ/ml).

Ces valeurs correspondent à un temps de demi-renouvellement de 133 à 139 minutes. Donc, par une approche toute différente, la cinétique déduite des expériences de courte durée avec une surcharge en PO_4^{---} confirme les conclusions obtenues avec des incubations de plus d'une heure.

---

* Ces notions sont trop connues pour que nous insistions sur les développements mathématiques qui les établissent. Rappelons seulement que S représente la concentration en substance traversant la membrane et V la vitesse d'entrée. Km (ou constante de MICHAELIS) traduit la concentration en S pour laquelle la vitesse d'entrée est égale à la moitié de la vitesse maxima : rappelons que la constante d'affinitié de S pour le site actif est représentée par I/Km.

Dans ces expériences, nous constatons une évolution à peu près parallèle des fractions PO_4 et ATP (Fig 24.). La radioactivité de la fraction minérale* est toujours supérieure à celle des nucléotides triphosphates. Mais il nous faut souligner le décalage des deux courbes : si la courbe des nucléotides (et il en est de même pour les autres fractions organiques) passe par l'origine, celle des orthophosphates, dans la mesure où nous sommes autorisés à extrapoler entre les temps 35 secondes et zéro, coupe l'axe des ordonnées au-dessus du point zéro. Ces résultats sont évidemment à rapprocher de ceux que traduisent les courbes 15 et 16.

B. L'EFFET DE COMPÉTITION

C'est l'une des caractéristiques les plus démonstratives de la diffusion facilitée. Ce mécanisme a été parfaitement défini pour les oses, et singulièrement pour le glucose, parce qu'on disposait de très nombreux analogues de structure :

— soit dans la série des multiples isomères des hexoses ;

— soit parmi les dérivés mono ou polysubstitués sur les six oxhydryles (en particulier dérivés méthylés).

Dans l'étude du problème qui nous intéresse ici, nous sommes évidemment moins favorisés. Nous pouvons considérer comme élément d'analogie structurelle le caractère polyvalent de l'anion. Dans les conditions physiologiques (pH = 7,4), la dissociation de l'ion orthophosphate est représentée par la répartition approximative :

$PO_4\,H_2^-$ ..... 20 pour cent

$PO_4\,H^{--}$ ..... 80 pour cent

En somme, pour les 4/5^e l'orthophosphate se comporte comme un anion bivalent et une distribution passive selon l'équilibre de GIBBS-DONNAN est représentée par le rapport :

$$\frac{(Cl^-)\ I}{(Cl^-)\ E} = \frac{[(PO_4\,H^{--})\ I]^{\frac{1}{2}}}{[(PO_4\,H^{--})\ E]^{\frac{1}{2}}}$$

Ce caractère bivalent de l'anion PO_4H^{--} nous amène à considérer les ions SO_4^{--} comme susceptibles de manifester un effet de compétition par analogie de structure.**

---

* Par conséquent, l'activité spécifique de P (PO_4), puisque sa concentration est inférieure à celle de l'ATP (exprimée en 2 P actifs).

** Cette analogie se justifie également sur le plan des dimensions ioniques : les diamètres des ions PO_4H^{--} et SO_4^{--} (sous leur forme hydratée) sont identiques : 4 angstrom (Harris) (104).

S'il faut que le transporteur contracte une liaison bivalentielle avec l'anion bivalent transporté pour être actif, l'introduction d'ions SO_4^{--} dans le milieu extracellulaire doit provoquer un encombrement du site actif et ralentir la vitesse de pénétration des ions orthophosphates.*

L'analogie de structure est encore plus étroite avec l'ion arséniate AsO_4^{---}. Elle rend d'ailleurs compte en enzymologie des propriétés de compétition des arséniates, dans les réactions où les phosphates sont indispensables.

Nous aurions donc là le parfait inhibiteur compétitif, capable d'entrer en combinaison avec le transporteur. En réalité, l'analogie est trop parfaite, car elle entraîne des répercussions sur la glycolyse : depuis longtemps déjà, on sait que les arséniates bloquent la dégradation du glucose à de faibles concentrations : l'interprétation de leur action sur une éventuelle diffusion facilitée risque de devenir impossible en introduisant cette variable supplémentaire.

En résumé, dans ce chapitre, nous explorerons l'effet de compétition des ions sulfates SO_4^{--} et arséniates AsO_4^{---}.

Technique : Nous avons fait varier simultanément :

— la concentration extracellulaire en ions PO_4^{---} (E), entre 0 et 300 γ par ml, et la concentration extracellulaire en ions compétiteurs SO_4^{--} ou AsO_4^{---}.

Nous avons mesuré le pourcentage d'échange après incubation de durée variable (0 à 120 minutes), à 37°, le milieu étant du KCl isotonique et l'hématocrite rétablie à 50.

Ces expériences ont évidemment nécessité de très nombreuses déterminations : nous avons dû choisir un protocole qui permette avec un seul échantillon de sang le plus grand nombre possible de comparaisons. Exemple :

— sur l'échantillon de sang hépariné (dont les globules ont été lavés deux fois au KCl isotonique et utilisés immédiatement après le prélèvement), 4 tubes ont été préparés et placés au bain-marie à 37° :

1 - P (PO_4)	= 60 γ/ml	S (SO_4) =	100 γ/ml
2 - "	= 60 "	" =	300 "
3 - "	= 60 "	" =	600 "
4 - "	= 60 "	" =	1 500 "

Un microprélèvement (0,5 ml) effectué aux temps suivants : 15' - 30' - 60' - 90', est centrifugé aussitôt à + 2° dans une microcentrifugeuse refroidie. Le surnageant est prélevé et le culot lavé trois fois avec du KCl isotonique refroidi à 0°.

---

* On peut considérer que l'ion SO_4^{--} n'intervient pas dans l'équilibre de GIBBS-DONNAN dans les conditions physiologiques, en raison de sa concentration plasmatique infime.

Le comptage final est réalisé en double, à la fois sur :

— les surnageants et les rinçages,

— et sur les culots, après hémolyse par l'eau distillée additionnée de 0,1 ml d'une solution aqueuse de digitonine saturée à froid.

Cette série a été répétée avec le même protocole en faisant varier la concentration extracellulaire en P (PO_4) (0 - 15 - 30 - 60 - 150 et 300 γ par ml). Dans chaque expérience, nous avons exprimé les effets d'une concentration donnée de l'ion compétitif en exprimant l'entrée globale de P (PO_4) (% d'échange) en pourcentage de l'entrée sans effecteur :

$$\frac{\%\text{ échange (concentration } SO_4 \text{ (E)} = x\gamma)}{\%\text{ échange (concentration } SO_4 \text{ (E)} = 0)} \times 100$$

Ainsi, ces séries obtenues avec des échantillons différents de sang, étaient comparables.

I. Influence des ions SO_4^{--} extracellulaires sur la pénétration des orthophosphates dans le globule rouge :

La cinétique de la pénétration des orthophosphates dans le globule rouge a été établie en faisant varier la concentration extracellulaire en ions SO_4^{--} entre 0 et 47 μmoles par ml, et la concentration en ions PO_4^{---} entre 0,3 et 5 μmoles.

Dans le tableau XXI, la pénétration des ions PO_4^{---} est exprimée en γ de P (PO_4) ayant pénétré dans 1 ml de globules rouges, après 15 - 30 - 60 et 90 minutes d'incubation à 37°. Si nous comparons les valeurs obtenues en 90 minutes (proches de celles de l'équilibre de répartition), nous voyons que dans des limites très larges de rapport molaire SO_4/PO_4, comprises entre 0 et 145, la perméabilité aux ions PO_4^{---} n'est pas influencée par la présence des ions sulfates extracellulaires. Le seul effet décelable des ions SO_4^{--}, encore que très limité, consiste en une accélération de la vitesse initiale d'entrée des ions PO_4^{---}. Les valeurs obtenues en 15 minutes d'incubation sont plus élevées lorsque la concentration extracellulaire en SO_4^{--} augmente.

Ces résultats démontrent que les ions sulfates extracellulaires ne manifestent pas d'effet de compétition sur l'entrée des ions orthophosphates dans le globule rouge.

II. Influence des ions AsO_4^{---} extracellulaires sur la pénétration des orthophosphates dans le globule rouge :

Le schéma expérimental adopté est le même que pour l'étude des ions SO_4^{--}. Nous avons toutefois restreint les limites de concentration des ions arséniates en raison de leur activité inhibitrice sur la glycolyse.

TABLEAU XXI

Cinétique de pénétration des ions PO_4^{---} en présence de concentration variable de sulfates
(3 séries d'expériences parallèles avec des concentrations P (PO_4) 10 - 60 - 150 γ par ml de G.R.)

γP (PO_4) E		γS (SO_4) E				
		0	100 γ	300 γ	600 γ	1 500 γ
10 γ	15′	1,05	1,04	1,04	1,21	1,47
	30′	1,93	1,96	2,02	2,14	2,32
	60′	3,18	3,24	3,10	3,30	3,37
	90′	3,77	3,67	3,81	3,83	3,94
60 γ	15′	7,44	7,32	7,80	7,98	9,66
	30′	12,48	12,30	12,06	13,20	13,80
	60′	17,22	17,16	17,04	17,40	17,88
	90′	20,46	20,28	20,42	20,34	19,98
150 γ	15′	17,10	17,40	18,90	19,05	22,35
	30′	29,25	29,85	31,35	33,15	37,95
	60′	43,65	45,30	44,25	45,15	45,30
	90′	48,90	49,20	48,60	47,40	49,50

Nous avons résumé dans le tableau XXII les effets des arséniates, en exprimant les variations de l'échange global en pourcentage de celui obtenu avec des globules sans inhibiteur. Il apparaît nettement que les ions arséniates, à concentrations élevées, ralentissent la pénétration des ions PO_4^{---} extracellulaires (fig. 27). Le mécanisme de ce ralentissement de l'entrée des orthophosphates est d'interprétation plus complexe.

Dans la figure 28, nous avons utilisé, pour diverses concentrations du milieu en ions arséniates, la représentation de LINEWEAVER-BURK, où l'inverse de la vitesse d'entrée des ions PO_4^{---} est représentée en fonction de l'inverse de la concentration extracellulaire en PO_4^{---}. Les droites convergent vers l'origine avec ou sans ions AsO_4^{---}, ce qui confirme l'absence de site actif dans le transport des orthophosphates.

TABLEAU XXII

Influence des ions AsO_4^{---} sur l'entrée des orthophosphates dans le G.R.
(l'entrée des ions PO_4^{---} en présence d'arséniates est exprimée en pourcentage de l'entrée sans arséniates)

Concentration P (PO_4) E en γ/ml	Concentration AsO_4^{---} en μMol/ml									
	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5	10
0	100	98,1	95,6		89,1	84,5	82,0			
15	100		100	100	94,1	91,1	90,4			
30	100		100		94,8	93,6	91,2	84,8		
60	100		100		95,5	89,7	89,7	83,5		
150	100		100			96,2	91,4	87,3	83,2	76,4
300	100		100			94,8	94,4	89,8	83,4	76,9

C'est l'analyse de la répartition du ^{32}P dans les divers compartiments intracellulaires qui nous donne l'explication. Nous avons soumis des globules rouges à une incubation de 60 minutes à 37°, dans un milieu où la concentration en PO_4^{---} et en ASO_4^{---} varient. Les tableaux XXIII et XIV rassemblent les résultats.

Le pourcentage d'échange (donc la quantité de P (E) ayant pénétré dans la cellule) diminue en présence d'arséniate. En réalité, cette diminution ne correspond pas à une inhibition de la perméabilité : si nous calculons la répartition du ^{32}P dans les deux compartiments intracellulaires, nous voyons en effet que le globule accumule dans la fraction orthophosphates plus de ^{32}P lorsque le milieu contient des arséniates. Au contraire, les ions ASO_4^{---} ralentissent l'incorporation dans le compartiment organique. Cette inhibition de la glycolyse — donc de la recharge de l'ATP — est

particulièrement nette dans le tableau XXIV : en présence d'arséniates, le taux de l'ATP s'abaisse (la somme des nucléotides adényliques demeurant constante) et l'activité spécifique des deux P terminaux ($\beta + \gamma$) est nettement plus basse.

En conclusion, le ralentissement de l'entrée des ions PO_4^{---} extracellulaires en présence d'arséniates n'est que la conséquence d'un blocage de la glycolyse, selon un mécanisme connu de longue date (239). La perméabilité n'est pas modifiée, la quantité de $^{32}P(E)$ qu'on retrouve dans la fraction minérale du globule est même plus élevée que normalement : mais le blocage de l'incorporation du P (PO_4) dans les fractions organiques modifie l'équilibre final.

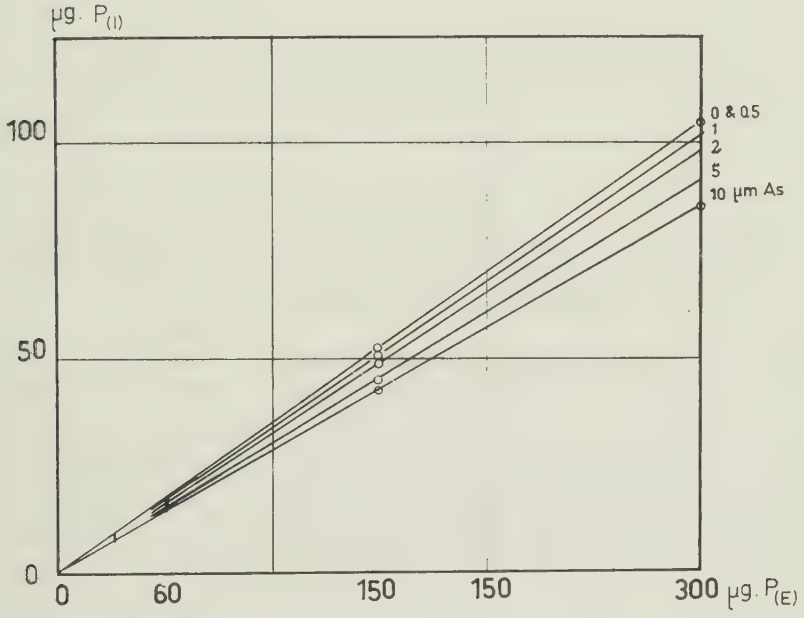


FIG. 27

Influence de la concentration en ions AsO^{4---} sur la pénétration des ions PO_4^{---} extracellulaires
Incubation KCl iso/37°/1 heure)

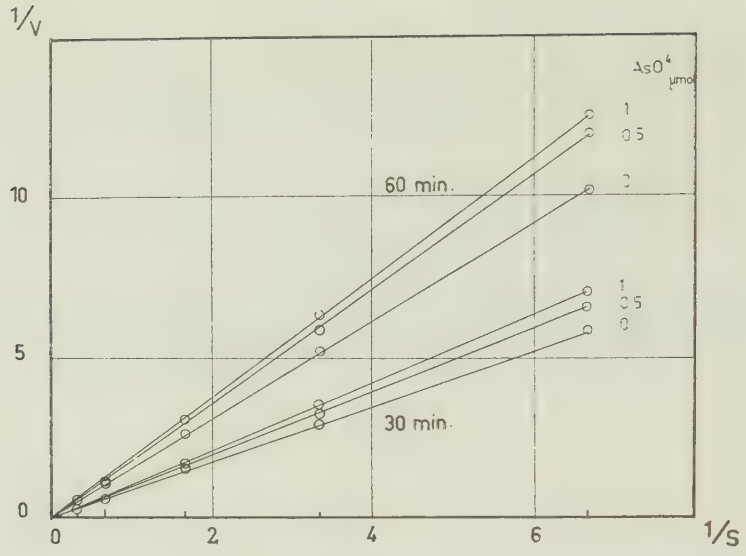


FIG. 28

Influence de la concentration en PO_4--- (E) sur la vitesse d'entrée — en présence d'arseniates — des ions PO_4--- dans le globule rouge (Incubation KCl iso/37°)

TABLEAU XXIII

Répartition du ^{32}P dans les divers compartiments intracellulaires après incubation de 60 mn à 37° en présence d'arséniates et de phosphates en concentration variable

Milieu extracellulaire		% Echange	P (E) ayant pénétré en γ/ml	P (E) retrouvé dans la fraction PO_4 (I)	P (E) retrouvé dans la fraction Porg.(I)	$\frac{^{32}P\ (PO_4)I}{^{32}Ptotal(I)} \times 100$
PO_4 γ/ml	AsO_4 µMol/ml					
0	0	32,8				
0	1	28,6				
60	0	31,5	18,9	5,1	13,8	26,9
60	5	25,1	15,1	5,6	9,5	37,2
300	0	30,7	92,0	46,8	45,2	50,9
300	10	27,1	81,2	61,1	20,1	75,2

TABLEAU XXIV

Les nucléotides adényliques du G.R. humain
après incubation de 60 mn à 37° en présence d'arséniates et de phosphates en concentration variable

Milieu extracellulaire		Nucléotides adényliques µMol/ml GR	Pourcentage			Activité spécifique ATP
PO_4 γ/ml	AsO_4 µMol/ml		AMP	ADP	ATP	
0	0	1,07	6,4	15,5	78,1	1 230
0	1	1,16	18,3	27,2	54,5	896
60	0	1,09	5,5	15,1	79,4	1 090
60	5	1,11	25,1	32,0	42,9	554
300	0	1,13	3,1	17,6	79,3	753
300	10	1,19	22,3	29,2	48,5	309

II. — LE TRANSPORT ACTIF

Contrairement à la diffusion facilitée, le transport actif nécessite, comme condition première, un couplage énergétique. Prouver un transport actif revient donc à mettre en évidence une liaison étroite entre le passage de la subtance et un des catabolismes de la cellule. Or, nous savons que les possibilités métaboliques d'un globule rouge — cellule en survie — sont très limitées ; en fait, seule, subsiste une glycolyse empruntant deux voies connues ; la démonstration d'un transport actif revient donc à prouver que l'entrée des ions PO_4^{---} est liée à la glycolyse.

Pour étudier le rôle de la glycolyse, nous pouvons :

— modifier le niveau de la glycémie,

— ou influencer l'intensité de la glycolyse en faisant varier le pH du milieu,

— ou encore inhiber la dégradation du glucose, à des niveaux déterminés des voies glycolytiques,

— enfin, dévier la voie glycolytique habituellement prépondérante vers une voie normalement accessoire.

Dans ces quatre types d'expériences, la cinétique de l'incorporation du PO_4 extracellulaire dans le globule et sa répartition dans les fractions organiques ont été déterminées.

A. — NIVEAU DE GLYCEMIE VARIABLE

Technique :

— Sang prélevé sur héparine.

— La concentration en glucose est ajustée en ajoutant des poids connus de D-Glucose :

  — soit au sang total,

  — soit à une solution isotonique de KCl, à laquelle les globules lavés sont ajoutés à volume égal (hématocrite 50).

— Le taux de glycémie initiale est vérifié après défécation immédiate et dosage du glucose selon la méthode de BAUDOUIN et LEVIN (14).

1 — G.R. en milieu plasmatique :

Le tableau XXV résume la cinétique de l'incorporation globale des ions PO_4^{---} extracellulaires dans le globule en fonction du taux de la glycémie (glycémies comprises entre 0,99 et 2,25 grammes par litre de sang total).

Dans ces limites de variations de la glycémie, il est évident que la vitesse de pénétration des ions PO_4^{---} n'est pas influencée. Ces résultats sont en accord avec ceux de CARTIER et BOUCHARD (39), dont les travaux montrent que la répartition des fractions organiques n'est pas affectée par le niveau de la glycémie. Toutefois, on ne peut se permettre de conclure à une indépendance complète des deux phénomènes. Le taux de glycémie le plus bas (qui correspond à une glycémie normale, sans addition de glucose) est suffisant pour entretenir la glycolyse pendant au moins 8 heures à 37°, à une vitesse normale (39). Il n'est donc pas surprenant qu'une addition supplémentaire de glucose prolonge la durée de la glycolyse sans en modifier l'intensité. C'est pourquoi nous avons substitué au plasma un milieu artificiel.

2. — **G.R. en milieu KCl isotonique :** il était intéressant de comparer l'entrée de PO_4 dans les globules en l'absence de glucose et en présence de concentrations croissantes en glucose (inférieure et supérieure à celles de la glycémie normale).

Les tableaux suivants rassemblent :

— la cinétique de l'incorporation globale de PO_4 (tableau XXVI),

— la répartition des nucléotides adényliques après une incubation de 15 minutes à 37° (tableau XXVII),

— l'activité spécifique des fractions adényliques (tableaux XXVIII et XXIX).

TABLEAU XXV

Influence du niveau de la glycémie sur la vitesse d'incorporation du $^{32}PO_4$ (E)
(Incubation Plasma/37°C)

Température	Durée d'incubation	Glycémie (g par litre)				Moyenne
		0,99	1,20	1,80	2,25	
30°	15'	4,7	4,4	4,1	4,5	4,4
	30'	8,5	8,6	7,9	8,4	8,4
	45'	12,6	12,8	11,6	12,3	12,3
	60'	15,8	15,1	14,5	15,4	15,2
40°	15'	17,1	16,8	17,3	16,4	16,9
	30'	29,7	27,5	30,0	28,5	28,9
	40'	39,8	38,0	38,8	37,8	38,6
	60'	45,7	43,5	43,0	45,0	44,3

TABLEAU XXVI

Influence de la concentration en glucose sur la cinétique de l'incorporation globale de PO_4

Concentration glucose en µg/ml	% Echange				
	5 minutes	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.
0	5,3	15,3	25,0	33,5	47,7
100	5,6	16,0	27,6	31,2	50,8
500	5,8	14,9	27,0	35,9	47,4
1 000	7,8	14,4	24,9	38,5	47,9
2 000	8,1	18,7	31,6	37,2	52,9
Moyenne	6,5	15,8	27,2	35,3	49,3
±	1,3	1,7	2,7	2,9	2,4

TABLEAU XXVII

Influence de la concentration en glucose sur la répartition des diverses fractions phosphorées
(incubation 15 minutes/KCl iso/37°)

Glucose	PO_4	ATP	ADP	AMP	P esters	P total
0	1,45	0,86	0,39	0,10	5,75	10,66
100γ	1,60	0,91	0,37	0,06	6,54	11,67
500γ	1,45	0,87	0,39	0,10	6,51	11,45
1 000γ	1,48	0,87	0,38	0,13	6,31	11,27
2 000γ	1,47	0,82	0,43	0,11	6,60	11,50
Moyenne	1,49	0,87	0,39	0,10	6,34	11,31
±	0,06	0,03	0,02	0,02	0,33	0,35

TABLEAU XXVIII

Influence de la concentration en glucose sur l'activité spécifique et la répartition du ^{32}P dans les diverses fractions phosporées du globule
(incubation 15 minutes/KCl iso/37°)

Glucose	PO_4	ATP	ADP
0	682	277	333
100γ	650	286	341
500γ	673	319	350
1 000γ	675	267	336
2 000γ	722	306	333
Répartition du ^{32}P dans chaque fraction :			
% Moyenne	61,2	30,7	8,0

TABLEAU XXIX

Influence de la concentration en glucose sur l'activité spécifique et la répartition du ^{32}P dans les diverses fractions phosphorées du globule
(incubation 60 minutes/KCl iso/37°)

Glucose	PO_4	ATP	ADP	AMP	Esters
0	1 080	734	959	244	329
100γ	1 065	675	992	234	349
500γ	1 067	707	985	238	569
1 000γ	1 078	688	972	206	390
2 000γ	1 077	726	952	164	312
Répartition du ^{32}P dans chaque fraction :					
% Moyenne	52,7	19,3	6,8	0,3	20,9

Ces résultats confirment que la vitesse de pénétration des ions PO_4^{---} extracellulaires, la concentration et le turnover des Phº dérivés intermédiaires de la glycolyse sont indépendants du niveau de la glycémie. Mais ils soulignent également que l'absence de glucose extra-cellulaire est sans influence sur la glycolyse : même lorsque l'expérience est prolongée pendant quatre heures, dans un milieu KCl isotonique privé de glucose, le glucose intracellulaire suffit pour maintenir une glycolyse d'intensité normale. Ce résultat est particulièrement net lorsqu'on compare les concentrations et les activités spécifiques des dérivés adényliques (tableau XXIX).

Il convient donc d'interpréter ces expériences avec prudence. Constater que la concentration extracellulaire en glucose ne modifie pas la pénétration des orthophosphates, ne signifie nullement que l'intensité de la glycolyse est sans influence sur la perméabilité, puisqu'une glycolyse d'intensité normale persiste pendant quelques heures, même en l'absence de glucose extracellulaire. Nous pouvons tout au plus remarquer que, la vitesse de pénétration du glucose dans le globule étant proportionnelle à la concentration extracellulaire, les ions PO_4^{---} ne sont pas associés au passage de l'ose à travers la membrane, (sous forme de glucose-phosphate) : ce qui constitue une notion solidement démontrée (225).

B. — MODIFICATIONS DE LA GLYCOLYSE EN FONCTION DU pH

Il est possible de modifier l'intensité de la glycolyse en faisant varier le pH du milieu d'incubation MURPHY (166), RUMMEL (208), CARTIER et BOUCHARD (39). Le maximum d'activité glycolytique se situe aux environs de pH 8,0 - 8,1 et, en dehors de ce pH optimum, les variations sont importantes : MURPHY (166) signale qu'une variation de 7,5 à 7,8 accroît de 50 % l'utilisation du glucose.

Nous disposons donc d'un moyen de contrôler l'intensité de la glycolyse ; c'est dans ces conditions de glycolyse variable que nous déterminerons la vitesse de pénétration des ions PO_4^{---}.* Nous avons mesuré simultanément les deux phénomènes : des globules rouges lavés ont été incubés à 37° dans un milieu isotonique tamponné (tampon Tris-maléate à 0,12 M) de pH compris entre 6,2 et 8,6.

Nous ne retiendrons de ce travail que les grandes lignes :

1. — La cinétique de l'incorporation globale de PO_4^- (E) :

Les courbes de pourcentage d'échange présentent un maximum aigu (Fig. 29), qui correspond au pH où la glycolyse est elle-même la plus intense : pH 8,0. A partir de la droite obtenue en coordonnées semi-logarithmiques, le temps de demi-renouvellement a été calculé : il varie considérablement avec le pH et passe par un minimum à pH 8,0.

2. — La répartition intracellulaire du $^{32}PO_4^{---}$:

La concentration intracellulaire en orthophosphates est plus élevée aux pH acides. Elle décroît vers un minimum atteint à pH 8,0 - 8,4, et remonte ensuite légèrement vers les valeurs alcalines (Fig. 30).

Cet équilibre intracellulaire est complexe : le minimum — qui correspond à l'optimum de la glycolyse — traduit évidemment l'incorporation rapide dans les dérivés de la glycolyse, particulièrement dans la fraction esters et l'ATP (courbes 31 et 33). Dans la zone acide, PO_4^{---} ne s'incorpore pas dans le compartiment organique, ce qui provoque son accumulation ; celle-ci est favorisée d'ailleurs par l'hydrolyse phosphatasique dont on sait (155) qu'elle est plus importante aux pH inférieurs à 7,3.

Dans la zone alcaline, la synthèse des esters est favorisée (155), mais l'ATP est déphosphorylé.

Au pH optimum de la glycolyse correspond une recharge intense de l'ATP. Elle se traduit par :

— une concentration maximum en ATP et minimum en AMP. (Au contraire, en pH acide, où la dégradation du glucose est faible, l'ATP

---

* Soulignons un argument qui semble peu en faveur d'un couplage : si le pH optimum de la glycolyse est aux environs de 8,0, celui de la pénétration des ions PO_4^{---} serait de 6,4 - 6,6 (selon RUMMEL) (208), c'est-à-dire dans une zone où l'activité glycolytique est très faible.

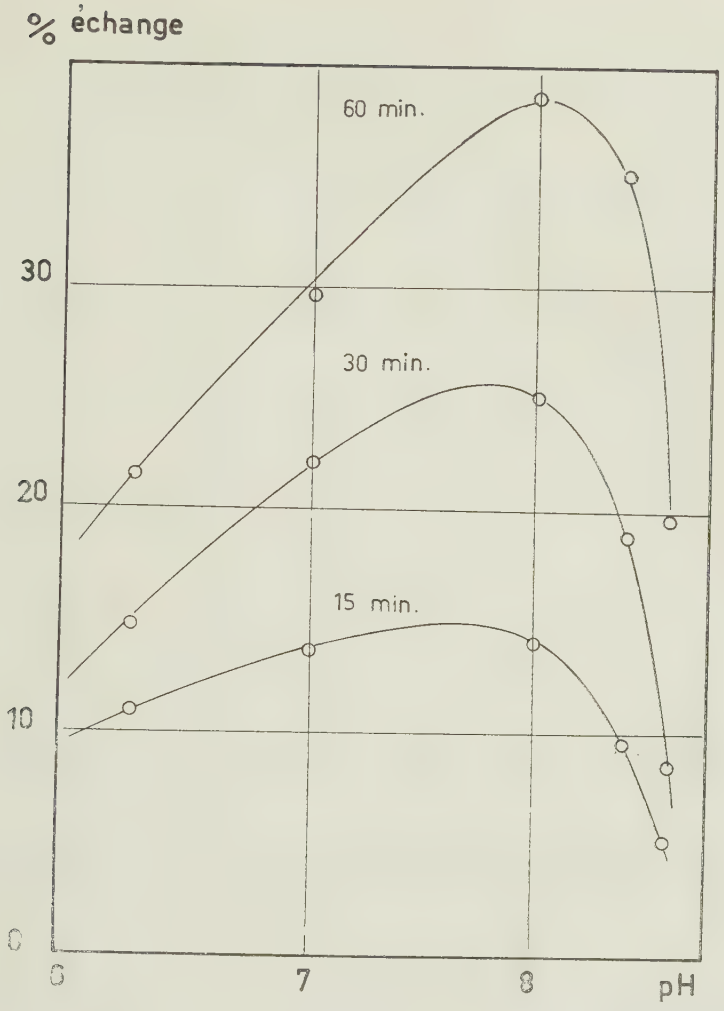


FIG. 29

Cinétique de l'incorporation du ^{32}P extracellulaire en fonction du pH du milieu d'incubation

se dégrade, la concentration en AMP s'élève et la somme des dérivés adényliques s'abaisse (courbe 31) — l'absence de recharge provoquant une désamination de l'AMP intracellulaire (119).

— Une incorporation intense de ^{32}P dans l'ATP. La courbe 33 montre qu'à pH 8,0 plus de la moitié du ^{32}P se retrouve dans cette fraction après une heure d'incubation, alors qu'à pH 6,2, elle représente 20 % seulement du ^{32}P intracellulaire.

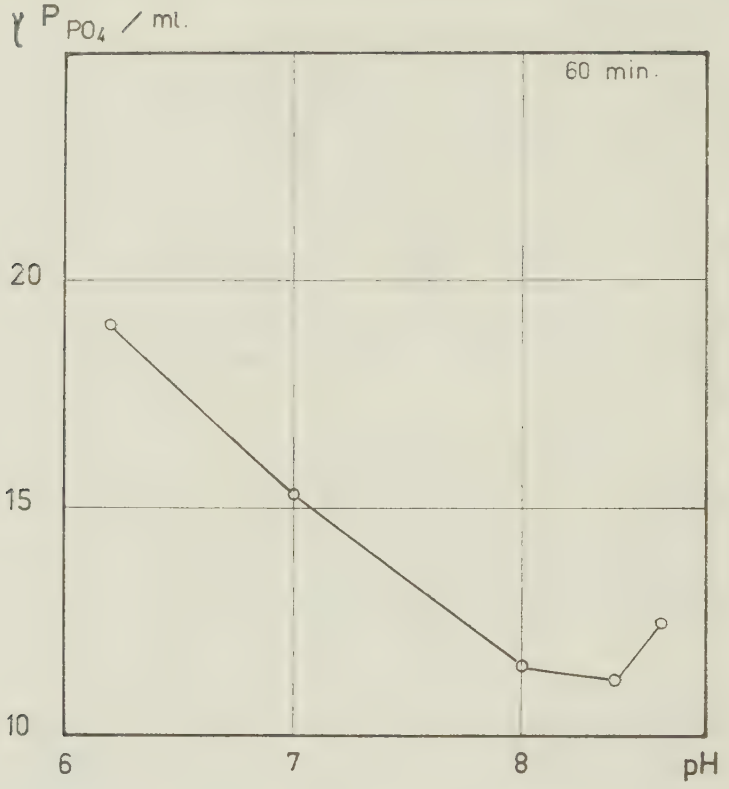


FIG. 30
Variations de la concentration intracellulaire en P (PO_4) en fonction du pH d'incubation

En résumé, la vitesse de pénétration du $^{32}PO_4^{---}$ (E) est la plus élevée au pH où la glycolyse est la plus intense : ces résultats sembleraient donc traduire l'existence d'un transport actif, associant perméabilité aux ions orthophosphates et glycolyse.

En réalité une interprétation toute différente découle de la comparaison des A.S. et de la répartition de ^{32}P dans les diverses fractions.

Un transport actif supposerait un précurseur organique dont la déphosphorylation secondaire serait à l'origine du PO_4^{---} (I). L'incorporation du $^{23}PO_4^{---}$ (E) devrait donc précéder son apparition dans la fraction PO_4. Or, nous l'avons précédemment souligné même en des temps très courts d'incubation, l'A.S. des ions PO_4^{---} intracellulaires toujours supérieure à celle des autres fractions, fait douter de l'existence d'un processus actif.

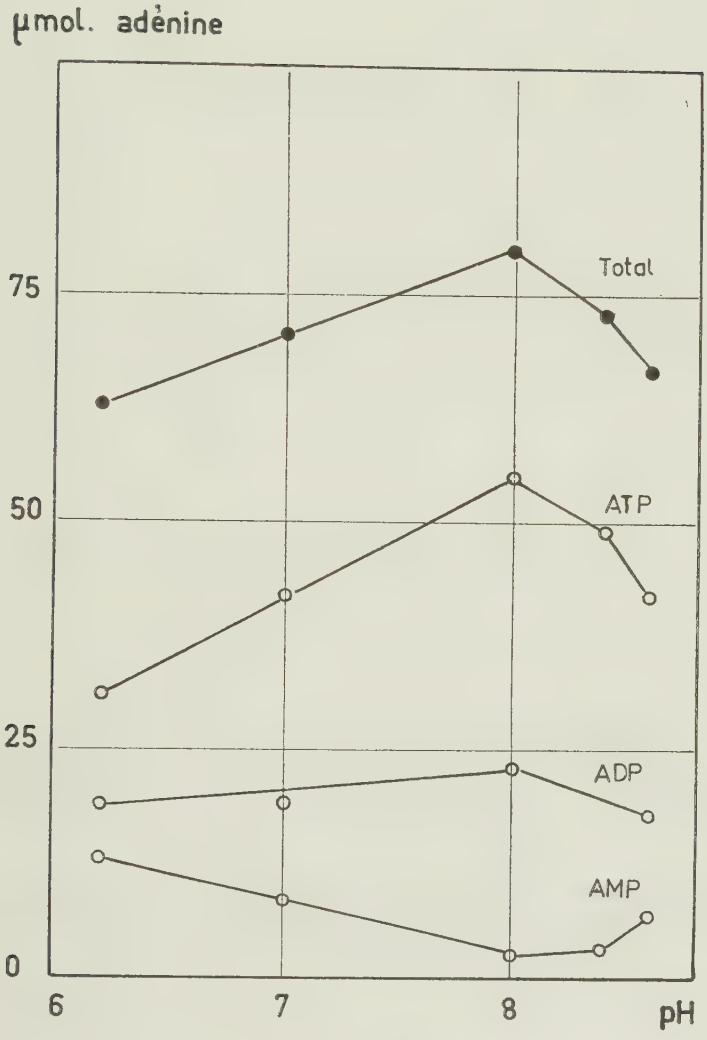


FIG. 31

Variations de la concentration des dérivés adényliques
(en γ Mol. adénine pour 1.000 ml de globules) en fonction du pH du milieu d'incubation
(1 heure/37°)

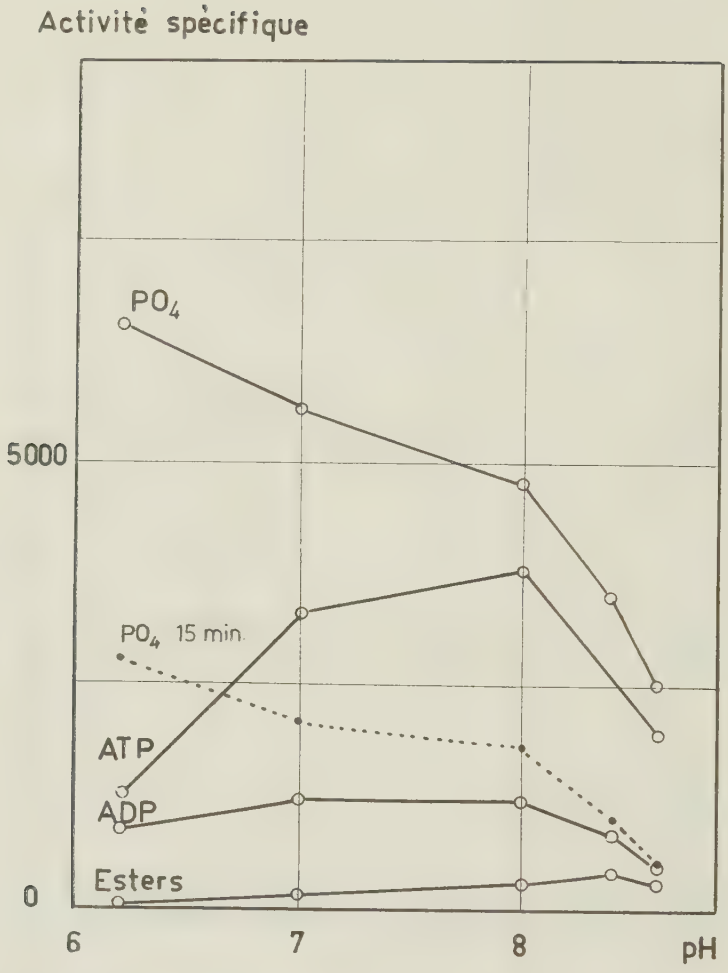


FIG. 32

Activité spécifique des diverses fractions intracellulaires en fonction du pH
(1 heure/37°)

I. — Nous retrouvons ce résultat, en faisant varier le pH : A toutes les valeurs, entre 6,2 et 8,6, l'A.S. du PO_4^{---} intracellulaire demeure constamment supérieure à celle de l'ATP. Elle s'en rapproche d'autant plus que la glycolyse est plus intense ; elle est jusqu'à 6 fois supérieure à celle de l'ATP aux pH acides où celle-ci est très faible (et cependant la concentration en PO_4^{---} (I) est alors la plus élevée).

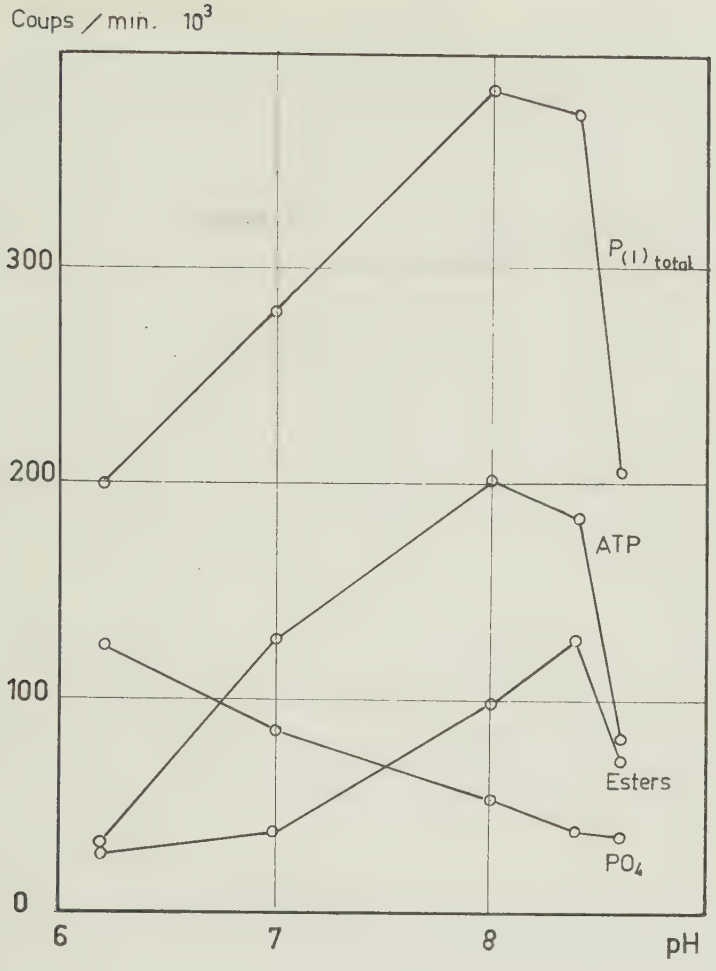


FIG. 33

Variation de l'incorporation globale en fonction du pH d'incubation du P (I) total et des diverses fractions

Ces variations des AS avec le pH sont les mêmes après des temps très courts d'incubation : les orthophosphates globulaires ne peuvent donc dériver d'un précurseur organique, puisque leur A.S. est toujours supérieure à celle des autres fractions. En outre, si un précurseur organique (vraisemblablement l'ATP) était à l'origine des ions PO_4^{---}, l'A.S. de ceux-ci devrait être la plus élevée dans la zone de pH où la glycolyse est la plus intense. Ce qui n'est pas.

2. Si nous établissons la répartition de ^{32}P dans les différentes fractions globulaires, nous constatons (tableau XXX) :

a) A pH 6,2 — où la glycolyse est très faible et le pourcentage d'échange également bas, 63 % du radiophosphore intra-cellulaire se trouve dans la fraction orthophosphate.

b) Par contre au maximum d'activité de la glycolyse, c'est-à-dire à pH environ 8,0, la fraction PO_4 ne représente plus que 15 pour cent et le compartiment organique 85 %.

TABLEAU XXX

Influence du pH du milieu sur la répartition du ^{32}P dans les diverses fractions phosphorées intraglobulaires
(incubation 60 minutes/KCl iso/37°)

pH	PO_4	ATP	ADP	Esters
6,2	63	17	6	14
7,0	31	46	9	14
8,0	15	52	8	25
8,4	11	49	6	34
8,6	18	40	7	35

En fait, le pourcentage d'échange qui traduit la cinétique de l'incorporation globale, ne permet pas de déduire le mécanisme de l'échange. Cet échange global traduit la résultante à l'intérieur du globule rouge, d'un double équilibre :

1. L'un, entre les ions PO_4^{---} (E) et les ions PO_4^{---} (I), équilibre lié à la perméabilité de la membrane.

2. L'autre, entre les compartiments minéral et organique intracellulaires ; cette répartition est réglée par l'intensité de la glycolyse.

Ainsi, malgré une glycolyse faible, le globule incorpore plus rapidement (à pH 6,4) les orthophosphates extra-cellulaires (courbes 32 - 33) et le second équilibre n'a pas lieu. Sans glycolyse, la diffusion règle la pénétration des orthophosphates. Au pH où la glycolyse intervient, la diffusion commande encore l'entrée des ions PO_4^{---} dans la cellule, mais le second équilibre d'incorporation dans les phosphodérivés de la glycolyse accroît considérablement le mouvement des ions PO_4^{---} d'une manière indirecte.

C. — INHIBITION DE LA GLYCOLYSE

Dans l'Introduction, nous avons souligné les divergences apparemment irréductibles que la littérature nous fournit sur l'action des inhibiteurs du métabolisme glucidique. Avant d'en faire l'étude détaillée, il nous était nécessaire de tester, sans idées préconçues, leur activité éventuelle sur la perméabilité des ions PO_4^{---} extracellulaires.

Nous avons exploré les effets de concentrations variées des effecteurs classiques de la respiration et de la glycolyse anaérobie : en nous appuyant sur les variations du pourcentage d'échange global, nous avons éliminé certains d'entre eux, comme étant sans action ; seuls ceux qui pouvaient éventuellement influencer la perméabilité ont été retenus.

La figure 34 résume ce travail préliminaire de sélection.

I. — **Les cyanures CN^-**, inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire, sont sans action sur la pénétration du PO_4^{---}. Si ce résultat est en désaccord avec les conclusions de HAHN-HEVESY (99) il n'est pas pour surprendre, puisque l'inhibition spécifique porte sur la partie terminale de la chaîne cytochromique qui fait entièrement défaut dans le globule rouge mature.

II. — **Le dinitrophénol** (DNP) est également dépourvu d'action. Là aussi l'explication semble logique puisque le DNP est connu comme agent découplant la phosphorylation jumelée au cheminement des électrons sur la chaîne cytochromique. Cet agent, qui perturbe profondément l'incorporation de PO_4^{---} dans les fractions organiques intracellulaires, ne peut agir que dans la mesure où l'entrée des ions ortophosphates dans le compartiment organique est liée à la respiration. Dans le globule rouge, l'absence de respiration, qui élimine ce type de phosphorylation, rend compte de l'inefficacité du dinitrophénol.

III. — **L'éthylène diamine tétracétate** (EDTA) est considéré comme un effecteur d'action plus nuancée, susceptible de modifier les réactions de la glycolyse là où certains ions métalliques sont nécessaires. Ses propriétés chélatrices vis-à-vis des cations bivalents, plus particulièrement des ions Mg^{++} expliquent des effets inhibiteurs, souvent faibles, toujours reversés par un excès de métal actif.

Dans la gamme des concentrations où nous l'avons employé (10^{-4} à 10^{-2} M), son action sur l'échange global est nulle. Nous avons d'ailleurs étudié ses effets d'une manière plus complète en analysant son rôle anticoagulant (41) : l'incorporation du P(E) dans les diverses fractions intracellulaires n'est pas affectée par l'EDTA.

IV. — **Le monoiodacétate** (MIA) : c'est un puissant inhibiteur de la glycolyse. Son rôle est parfaitement défini : il réagit avec les fonctions — SH des protéines, et la combinaison ainsi formée inactive les thiols-enzymes. Dans la chaîne anaérobie d'EMBDEN-MEYERHOF, le monoiodacétate bloque la dégradation au niveau des trioses phosphates en inhibant spéci-

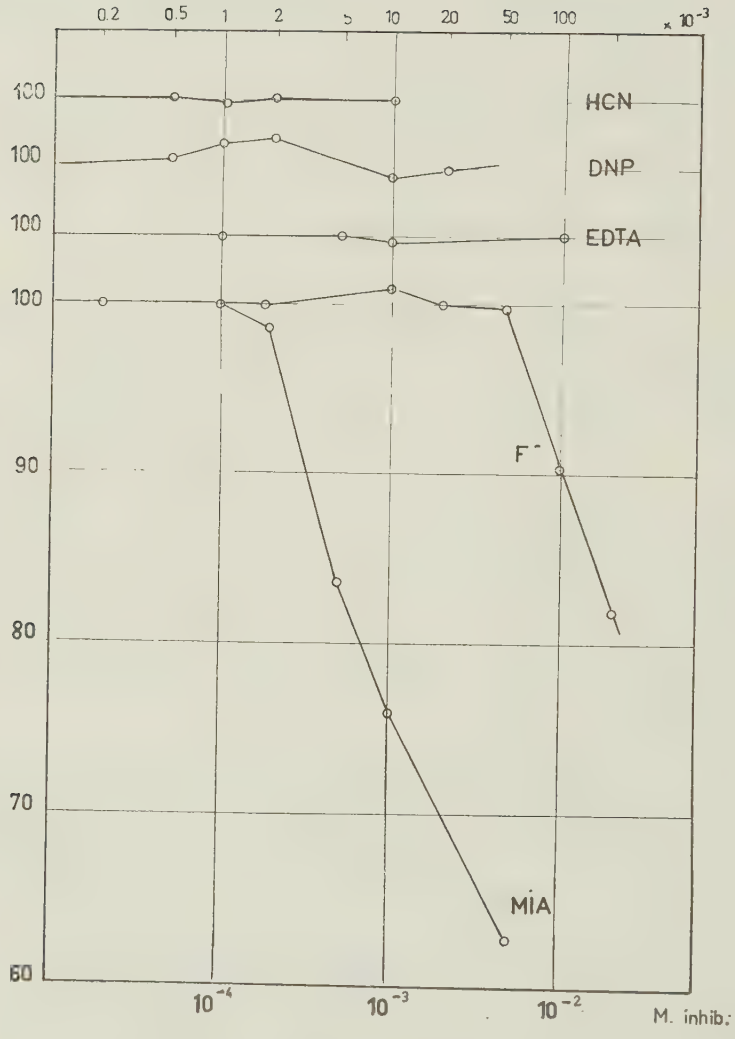


FIG. 34

Influence des inhibiteurs sur l'entrée globale des ions PO_4---
(exprimée en pourcentage d'inhibition)

fiquement la triosephosphate deshydrogénase. La figure 34 montre que l'entrée des ions PO_4^{---} est profondément modifiée. L'action du MIA s'intensifie avec la concentration : elle est déjà sensible à 2.10^{-4} M.

Nous avons choisi, pour analyser ses effets sur la perméabilité, la concentration relativement faible de 5.10^{-4} M, où l'inhibition est cependant très nette.

V. — **Le parachloromercuribenzoate** (PCMB) : Cet inhibiteur des thiols-protéines, forme — comme le monoiodacétate — une combinaison inactivante avec les groupements thiols. En l'utilisant dans les limites de concentrations 2.10^{-5} à 2.10^{-3} M, nous n'avons jamais décelé d'action sensible sur l'entrée des ions PO_4^{---}. Ces résultats peuvent paraître surprenants, si on les rapproche de ceux qu'on obtient avec le MIA. En réalité, l'action du p-chloromercuribenzoate sur la triosephosphate deshydrogénase est moins spécifique : c'est un médiocre inhibiteur de la glycolyse aux concentrations faibles ; et aux concentrations plus élevées, il provoque des altérations de structure de la membrane cellulaire (qui se traduisent par une hémolyse).

Il n'est d'ailleurs pas exclu que la différence constatée entre les deux thiols-inhibiteurs soit associée à leur pouvoir de pénétration dans la cellule : il est vraisemblable que le PCMB traverse très difficilement la membrane.*

VI. — **Les ions fluorures (FNa) :** Ils inhibent la glycolyse. Leur action antiglycolytique et anticoagulante est bien connue. Ils bloquent la dégradation du glucose en fin de chaîne d'EMBDEN-MEYERHOF, en empêchant la transformation du 2-Phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate. L'étude de l'incorporation globale nous montre qu'il faut atteindre des concentrations élevées, de l'ordre de 10^{-2}M, si on veut déceler une action sur l'entrée des ions PO_4^{---} dans le globule rouge (figure 34).

Nous pouvons résumer les conclusions générales qui se dégagent de ces expériences d'orientation :

— les agents qui bloquent la chaîne respiratoire (CN^-), ou qui découplent à ce niveau les phosphorylations (DNP), sont sans action sur le transport des ions PO_4^{---} à travers la membrane du globule rouge,

---

* Si nous étions certains de la validité de cette explication, l'absence d'activité du p-chloromercuribenzoate lèverait l'objection importante opposée à certains inhibiteurs (en particulier le monoiodacétate). Qu'un inhibiteur (dont l'action antiglycolytique est reconnue) ralentisse ou bloque l'entrée des ions PO_4^{---} ne prouve pas que la glycolyse soit associée au transport : cet agent peut aussi bien réagir avec des groupements thiols des protéines de structure de la membrane et modifier localement les possibilités de transport. Le fait que le PCMB soit sans action semble indiquer que cette dernière explication n'est pas valable ici. D'ailleurs, nous verrons que l'analyse plus précise de la répartition des ions PO_4^{---} (E), après leur passage dans la cellule, rend inutile cette interprétation du freinage de la perméabilité aux ions PO_4^{---}.

— les agents qui éliminent de leur champ d'action des métaux à activité coenzymatique (tels les chélateurs du type EDTA ou les citrates) (41) n'influencent pas la perméabilité,

— le blocage de la glycolyse par des inhibiteurs puissants et spécifiques (monoiodacetate, fluorure) entraîne un ralentissement important de l'entrée des ions PO_4^{---} (83), (88), (165), (188), (138).

Dans les expériences suivantes, nous analyserons d'une manière plus détaillée le mécanisme du freinage de la perméabilité aux ions orthophosphates par le monoiodacétate et les fluorures : ainsi pourrons-nous essayer d'en dégager la participation de la glycolyse au transport.

I. Inhibition par le Monoiodacétate :

Le monoiodacétate est un puissant inhibiteur de la glycolyse : ses effets sont déjà sensibles à des concentrations de l'ordre de 1.10^{-5} M. L'action du MIA sur la pénétration des ions orthophosphates a été étudiée dans une zone de concentration où aucune hémolyse ne se manifeste au cours d'une incubation prolongée à 37°, bien que l'incorporation du phosphore dans les intermédiaires de la glycolyse soit fortement ralentie. Dans la plupart des expériences, une concentration extracellulaire de 5.10^{-4} M a été adoptée.*

Les techniques sont les mêmes que dans les chapitres précédents. Nous avons toujours réalisé simultanément une expérience d'inhibition et une expérience témoin avec le même échantillon de sang hépariné fraîchement prélevé ** : nous figurerons comparativement les résultats des deux expériences.

Comme nous l'avaient montré les expériences d'orientation, le monoiodacétate ralentit la pénétration des ions PO_4^{---} (E) dans le globule rouge (figure 35). L'allure générale de la courbe d'entrée de PO_4^{---} n'est pas modifiée, mais l'incorporation globale du ^{32}P est fortement abaissée, quelle que soit la concentration extracellulaire en P (PO_4).

La pénétration globale du ^{32}P (E) varie linéairement avec la concentration extracellulaire en PO_4^{---} : la figure 36 met en évidence cette proportionnalité pour différentes durées d'incubation à 37°.

Les caractéristiques cinétiques de la perméabilité aux ions orthophosphates, précédemment définies, sont donc conservées lorsqu'on introduit dans le milieu extracellulaire du monoiodacétate : seule, l'intensité de la pénétration est nettement diminuée.

---

* Dans les quelques expériences où la concentration en MIA est différente, l'indication en a été portée sur le tableau ou la courbe.

** Le monoiodacétate a été purifié et la solution-préparée extemporanément-neutralisée à pH 7,4 par de la soude diluée.

Nous ne pouvons pousser plus avant l'analyse du phénomène qu'en précisant comment se répartit le ^{32}P qui a pénétré dans la cellule. Cette répartition entre le compartiment minéral et le compartiment organique associé à la glycolyse, est profondément modifiée. A la concentration de 5.10^{-4} M, le monoiodacétate inhibe la glycolyse et ralentit le marquage du compartiment organique : les résultats du tableau XXXI sont particulièrement significatifs de ce blocage qui entraîne :

— une absence de recharge de l'ATP, dont la concentration s'effondre ainsi que l'activité spécifique ;
— une accumulation d'AMP ;
— une diminution de la somme des nucléotides adényliques : l'absence de recharge et l'accumulation d'AMP favorisent en effet les réactions de déphosphorylation et de désamination du nucléotide monophosphorique (45).

Examinons maintenant ce qui se passe au niveau du compartiment minéral intracellulaire : Bien que la pénétration du ^{32}P à travers la membrane soit ralentie, la fraction orthophosphate du globule contient plus de ^{32}P en présence de MIA qu'en l'absence de celui-ci (figure 37).

TABLEAU XXXI

Influence de l'acide monoiodacétique sur les dérivés adényliques du globule rouge humain

	Sans Monoiodacétate			Monoiodacétate 5.10^{-4} M		
	µMol./ml.	%	A.S.	µMol./ml.	%	A.S.
I - ATP	0,937	62,1	1 107	0,228	17,8	43
ADP	0,412	27,3	778	0,279	21,8	89
AMP	0,160	10,6	—	0,774	60,4	—
	1,509			1,281		
II - ATP	0,851	79,3	3 316	0,095	10,6	145
ADP	0,205	19,1	4 505	0,089	9,9	1 366
AMP	0,018	1,6	—	0,711	79,5	—
	1,074			0,895		
III - ATP	0,712	69,2	1 470	0,133	14,2	87
ADP	0,252	24,5	1 729	0,133	14,2	426
AMP	0,065	6,3	—	0,673	71,6	—
	1,029			0,939		

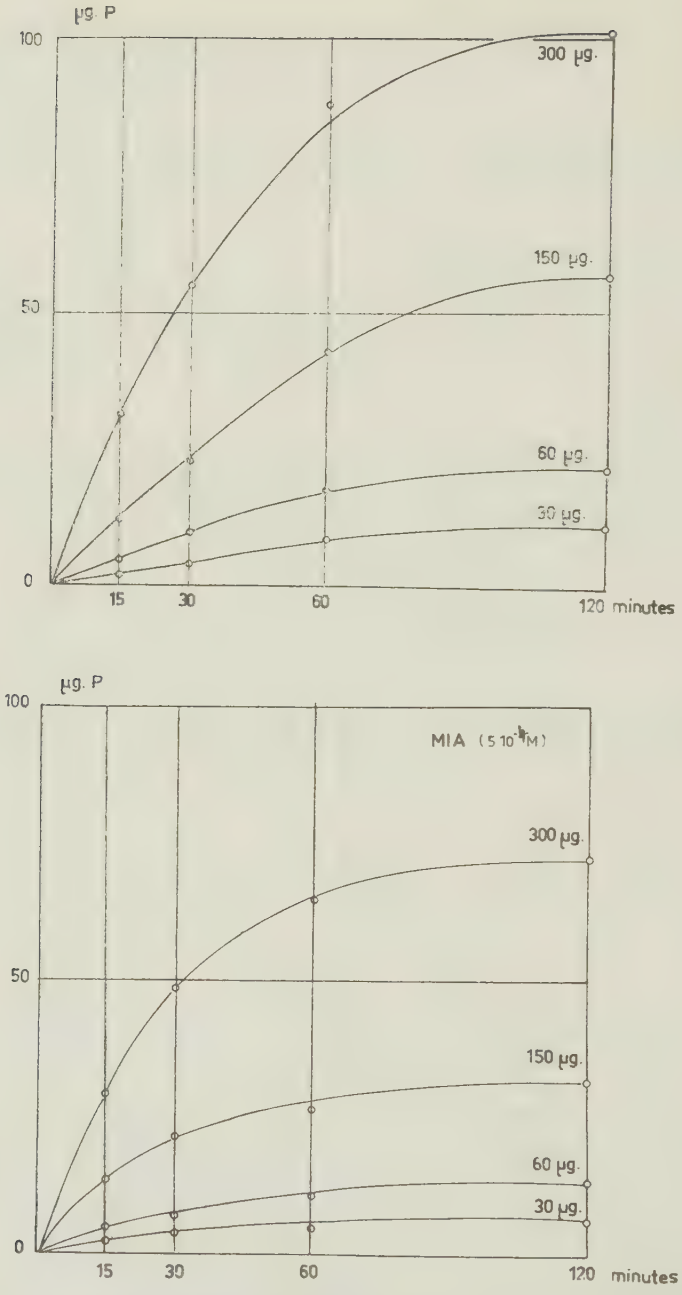


FIG. 35

Cinétique de l'incorporation globale du ^{32}P dans le globule rouge en fonction de la concentration en PO_4--- extracellulaire

(en ordonnées : µ g de P ayant pénétré dans le globule)

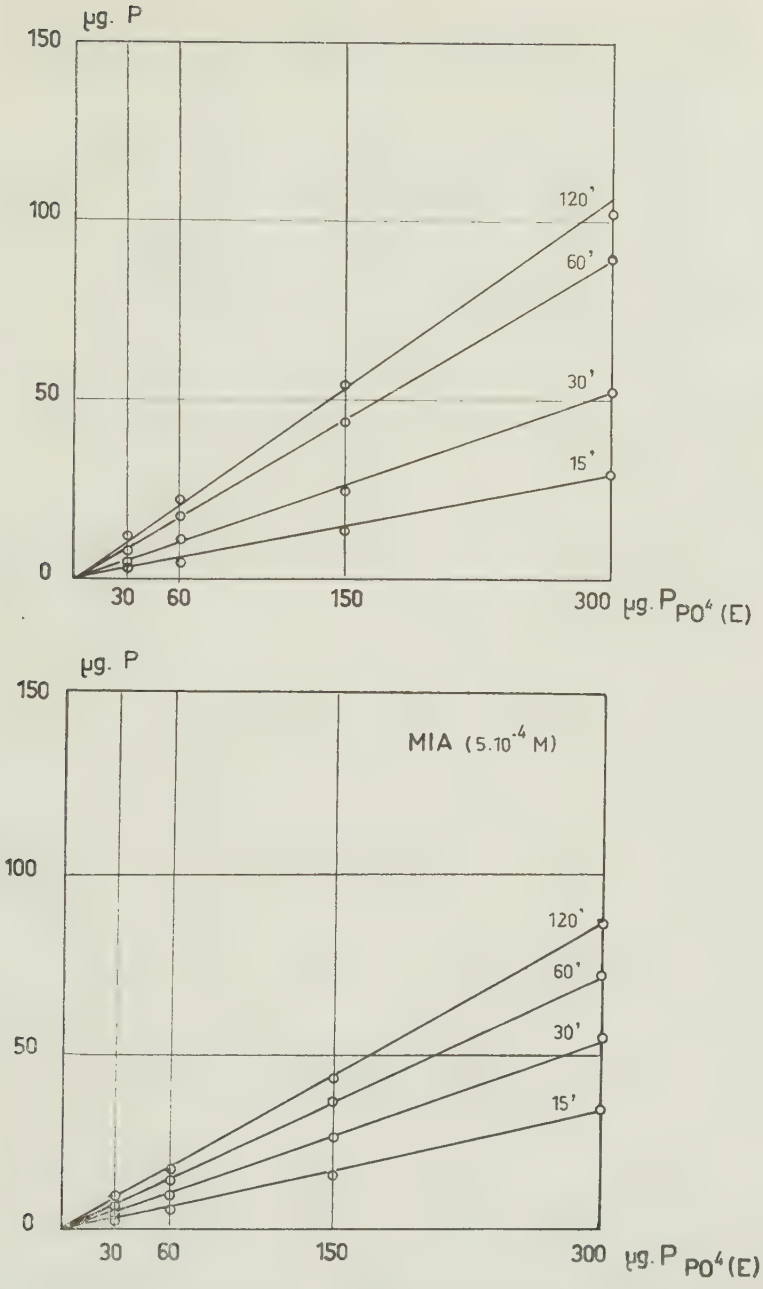
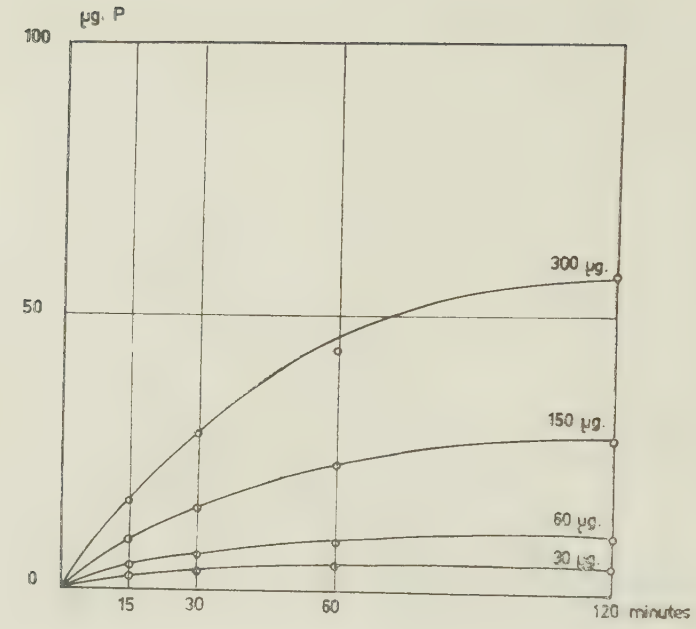


FIG. 36
Influence de la concentration en PO_4--- extracellulaire sur l'incorporation globale du ^{32}P dans le globule rouge
(en ordonnées : µ g de P ayant pénétré dans le globule)



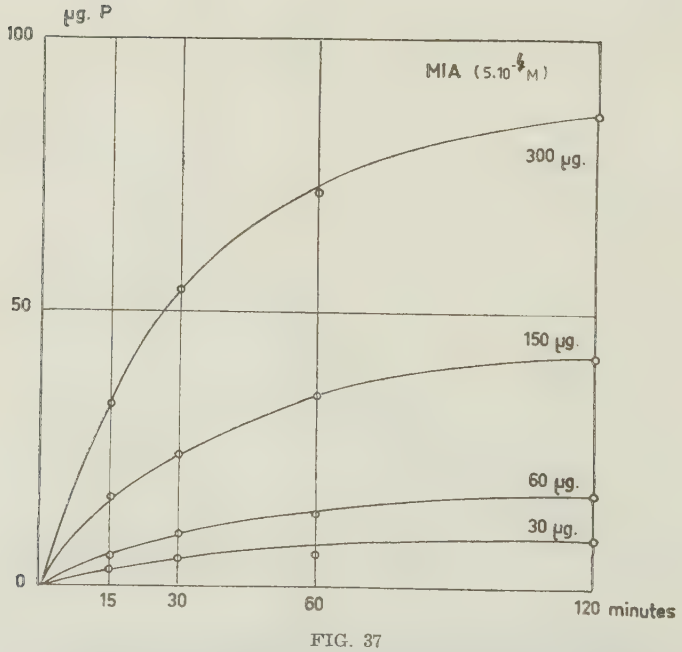


FIG. 37

Cinétique de l'incorporation du ^{32}P dans la fraction PO_4 intracellulaire
(en ordonnées : µ g de P (PO_4) E incorporés dans (PO_4) I

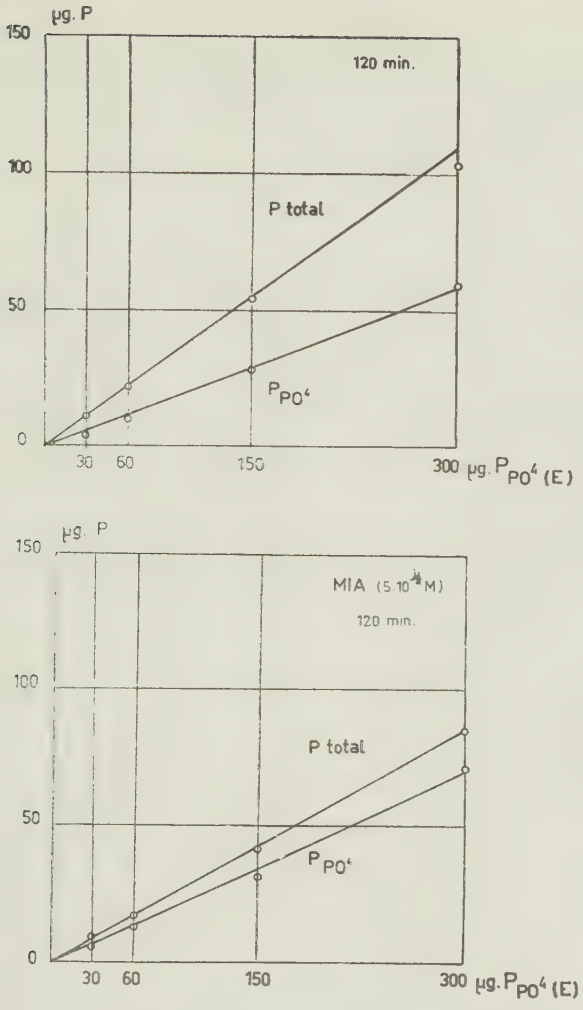


FIG. 38

Répartition du ^{32}P ayant pénétré dans la cellule en fonction de la concentration en PO_4--- extracellulaire

La figure 38 explicite ce bilan de la répartition de P minéral (I) et P organique (I).

Après deux heures d'incubation à 37°, la quantité totale de P (E) qui a traversé la membrane est nettement plus faible en présence de monoiodacétate (100 γ sans MIA et 86 γ avec MIA). Mais la fraction PO_4 (I) 72 représente [illegible] γ de P dans le globule inhibé et 60 γ dans le globule témoin. La répartition entre les deux fractions est la suivante :

TABLEAU XXXII

Influence du monoiodacétate sur la répartition du ^{32}P incorporé dans les fractions P minéral et P organique

^{32}P incorporé dans :	sans MIA	(5.10^{-4} M) MIA
–P minéral	60	84
–P organique	40	16

En inhibant la glycolyse, le monoiodacétate bloque les mouvements de P (PO_4) I vers le compartiment organique. Mais ce blocage a pour conséquence une accumulation du P (PO_4) I dont la concentration s'élève.

Malgré une perturbation très importante de la glycolyse et de l'entrée du phosphore dans les dérivés de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF, la pénétration des ions PO_4^{---} dans la cellule n'est pas entravée. Telle est la conclusion qui s'impose. Seules, sont modifiées les concentrations à l'équilibre des divers compartiments. La cinétique d'entrée en présence de monoiodacétate conserve les caractères que nous avons définis avec le globule normal. En particulier, le flux d'entrée des ions PO_4^{---} (E) demeure strictement proportionnel au gradient de potentiel électrochimique entre les milieux extra et intracellulaires.

II. **Inhibition par les Fluorures :**

Le domaine de concentration en ions fluorures, dans lequel il est possible d'explorer l'action sur la perméabilité, est très réduit : au-dessous de 1.10^{-2} M, cette action est nulle et à une concentration supérieure à 2.10^{-2} M, une hémolyse commence à apparaître après une heure d'incubation à 37° : nous avons donc été contraints de nous placer dans ces limites de concentration. Nous avons choisi la concentration extracellulaire de 2.10^{-2} M, bien qu'elle corresponde à une inhibition modérée de la glycolyse, et limité la durée d'incubation à 15 minutes à 37° pour minimiser les risques d'hémolyse.

Nous avons adopté la même technique que pour le monoiodacétate, et les effets de l'inhibition ont été déterminés par comparaison avec une expérience témoin effectuée sur le même échantillon de sang. Nous n'insisterons pas sur le protocole expérimental qui est celui du monoiodacétate.

Les tableaux XXXIII à XXXV rassemblent les résultats de l'inhibition de la glycolyse par l'ion fluorure.

L'inhibition de la glycolyse est évidente : elle se traduit par une diminution de la concentration intracellulaire en ATP et par l'accumulation d'AMP (Tableau XXXIII). Dans ce cas, nous l'avons déjà souligné, la concentration totale en nucléotides adényliques s'abaisse, car l'AMP est sensible à l'action de désaminases et d'enzymes de dégradation (tableau XXXIV).

TABLEAU XXXIII

Concentration des diverses fractions phosphorées intraglobulaires
(incubation de 15 minutes à 37° en présence de fluorure)

	Sans fluorure	Fluorure 2.10^{-2}M
Pourcentage d'échange (15 min/37°)	12,0	11,2
γ P (PO_4)	7,5	29,6
γ P esters	260	311
γ P (ATP)	72,5	48,4
γ P (ADP)	18,6	6,8
γ P (AMP)	2,2	6,2

TABLEAU XXXIV

Répartition et concentration totale en nucléotides adényliques
(incubation de 15 minutes à 37° en présence de fluorure)

Répartition (en %)	Sans fluorure	Fluorure 2.10^{-2}M
ATP	67,9	62,9
ADP	25,9	13,7
AMP	6,2	23,4
Somme des nucléotides adényliques (en μmoles/ml G.R.)	1,13	0,82

TABLEAU XXXV

Activité spécifique et pourcentage de répartition du ^{32}P dans les diverses fractions phosphorées du globule rouge
(incubation de 15 minutes à 37° en présence de fluorure)

Activités spécifiques	Sans fluorure	Fluorure 2.10^{-2}M
PO_4^{---}	766	680
Esters	86	124
ATP	579	50
Répartition du ^{32}P en %		
PO_4^{---}	9,1	15,8
Esters	35,5	66,3
ATP	45,2	3,2

Le marquage isotopique met mieux encore en évidence ce blocage de la recharge de l'ATP : l'activité spécifique de l'ATP tombe, après 15 minutes d'incubation à 37°, au 1/10e de sa valeur (tableau XXXV) ; exprimée en pourcentage du ^{32}P total, la fraction ATP devient ainsi très faible (3,2 pour cent au lieu de 45,2).

Assurément dans ces expériences avec les fluorures, le degré d'inhibition de la glycolyse est plus discret qu'avec le monoiodacétate, il n'en reste pas moins que nos constatations sont analogues : le blocage de l'incorporation des ions orthophosphates intracellulaires dans les phosphodérivés de la glycolyse provoque une accumulation du P (PO_4).

Soulignons également que le blocage au niveau de l'énolase favorise l'accumulation des esters phosphoriques au-dessus du point d'inhibition : la concentration en esters phosphoriques est effectivement augmentée, et leur activité spécifique est de 50 pour cent environ plus élevée que dans le témoin.

En conclusion, les fluorures, bien qu'inhibant la glycolyse et la recharge de l'ATP, ne modifient pas le pourcentage d'échange global entre P (PO_4) extracellulaire et P (PO_4) intracellulaire. L'élévation de la concentration intracellulaire en PO_4^{---} traduit une accumulation du P minéral qui est incapable d'entrer dans les phosphodérivés de la glycolyse.*

III. **Inhibition par les arséniates :**

Nous avons montré que, malgré leur analogie de structure avec les ions PO_4^{---}, les ions AsO_4^{---} ne manifestent pas d'effet de compétition sur l'entrée dans le globule des orthophosphates. L'équilibre de répartition est toutefois légèrement différent. Ces modifications évoquent, quoique plus discrètement, celles que nous venons de définir avec le monoiodacétate et les fluorures : elles traduisent l'effet inhibiteur des ions AsO_4^{---} sur la glycolyse.

Nous avons déterminé en présence d'arséniates la répartition des dérivés adényliques et l'incorporation du ^{32}P dans les diverses fractions intracellulaires.

Les tableaux XXXVI et XXXVII rassemblent les résultats. Le blocage de la glycolyse est encore plus modéré qu'avec les fluorures. Cependant, la recharge de l'ATP est nettement entravée, bien que la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans l'ATP soit moins ralentie qu'avec les inhibiteurs précédents.

Les expériences en présence d'arséniate ayant été réalisées avec des concentrations variables mais connues de P (PO_4) extracellulaire, il nous est possible d'exprimer quantitativement la pénétration du P extracellulaire. Deux valeurs sont déterminées :

---

* L'accumulation des orthophosphates intracellulaires ne peut s'expliquer ici par une prédominance de l'hydrolyse des esters sur l'incorporation dans les fractions organiques, puisque les fluorures sont généralement des inhibiteurs efficaces des phosphatases.

— quantité totale de P (PO_4) extracellulaire qui a traversé la membrane en une heure d'incubation à 37° ;

— quantité de P extracellulaire retrouvée dans la fraction orthophosphate et pourcentage de répartition entre P minéral et P organique.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau XXXVIII.

Ce dernier tableau explicite mieux encore le mécanisme du ralentissement de l'entrée des ions PO_4^{---} dans la cellule. En présence de l'inhibiteur de la glycolyse, la quantité de P ayant traversé la membrane en une heure d'incubation s'abaisse (ici, de 12 à 20 pour cent environ). Mais en réalité, la quantité retrouvée de l'autre côté de la membrane, dans la fraction minérale, est plus élevée en présence d'arséniates : ce n'est pas le mécanisme de perméabilité qui est affecté par le blocage de la glycolyse, mais l'équilibre entre les deux compartiments intracellulaires. L'entrée dans les phosphodérivés organiques associés à la glycolyse est ralentie et les orthophosphates s'accumulent à un niveau d'équilibre plus élevé que normalement.

TABLEAU XXXVI

Répartition intracellulaire
des composés phosphorés acido-solubles du globule rouge humain
en présence d'arséniates et avec des concentrations variables
en P (PO_4) extracellulaire

	P (PO_4) = 0		P (PO_4) = 60γ		P (PO_4) = 300γ	
	sans Arséniate	1.10^{-3} M AsO_4	sans Arséniate	5.10^{-3} M AsO_4	sans Arséniate	1.10^{-2} M AsO_4
%Echange	32,8	28,6	31,5	25,1	30,6	27,1
γ P(PO_4)	20,5	37,0	30,5	(28,5)	86,0	102,0
γ (Pesters)	31,8	30,6	31,5	32,5	29,3	30,2
γ P(ATP)	78.1	54,0	80,8	44,5	83,6	54,0
γ P(ADP)	10,3	18,0	10,3	22,1	12,3	21,7
γ P(AMP)	0,21	0,61	0,19	0,86	0,11	0,83

TABLEAU XXXVII

Répartition des dérivés adényliques et A.S. des fractions phosphorées intracellulaires en présence d'arséniate

	$P(PO_4) = 0$		$P(PO_4) = 60\gamma$		$P(PO_4) = 300\gamma$	
	sans Arséniate	1 µM AsO_4	sans Arséniate	5 µM AsO_4	sans Arséniate	10 µM AsO_4
Répartition (en %)						
ATP	78,2	54,5	79,3	42,9	79,3	48,5
ADP	15,5	27,2	15,2	32,0	17,5	29,2
AMP	6,3	18,3	5,4	25,1	3,1	22,3
Somme adénylique : (en µmol./ml.)	1,07	1,16	1,11	1,09	1,13	1,19
Activités spécifiques :						
PO_4^{---}	1 527	1 755	1 391	1 639	997	998
Esters	74	57	80	164	72	25
ATP	1 230	896	1 090	554	753	309

TABLEAU XXXVIII

Répartition du ^{32}P ayant pénétré dans la cellule, entre les deux compartiments (minéral et organique)
(Incubation une heure à 37°)

P (E) γ/ml	AsO_4 (E)	γ P ayant pénétré	γP retrouvé dans PO_4 (I)	Pourcentage du P (I) incorporé dans	
				P (PO_4)	P organique
60	0	18,9	5,1	26,9	73,1
60	5.10^{-3} M	15,1	5,6	37,2	62,8
300	0	92,0	46,8	50,9	49,1
300	1.10^{-2} M	81,2	61,1	75,2	24,8

D. DEVIATION DE LA GLYCOLYSE PAR LE BLEU DE METHYLENE :

En bloquant la glycolyse à des niveaux divers et avec une efficacité variable, les inhibiteurs (monoiodacétate, fluorure, arséniate) ont permis de montrer que la cinétique de l'entrée des ions PO_4^{---} dans la cellule n'est pas modifiée et que les différences de vitesse de pénétration constatées résultent d'un déplacement de l'équilibre normal entre les deux fractions intracellulaires (P (PO_4) et P organique).

Avec le bleu de méthylène, nous disposons d'un moyen d'influencer dans l'autre sens cette répartition intracellulaire. On sait, en effet, depuis les travaux de BARRON et de ses coll. (106) (8), que le bleu de méthylène augmente considérablement la consommation d'oxygène du globule rouge humain. Le Qo^2 peut même approcher des valeurs mesurées avec des hématies nuclées d'oiseaux ! Parallèlement, la glycolyse est accrue dans de fortes proportions.

Cette consommation supplémentaire de glucose n'emprunte que très partiellement la voie glycolytique normale d'EMBDEN-MEYERHOF. « Le quotient glycolytique »*, qui est normalement voisin de 1, s'abaisse en présence de bleu de méthylène. Le mécanisme de cette action a été établi par le marquage isotopique : le glucose $1^{14}C$ — du moins en grande partie — est directement décarboxylé et la radio-activité apparaît essentiellement dans le $^{14}CO_2$ (29). C'est une stimulation de la voie des hexoses monophosphates qui rend compte de la consommation accrue de glucose et d'oxygène, le bleu de méthylène intervenant comme accepteur artificiel d'électrons dans la réoxydation du TPNH.

Le bleu de méthylène nous offre donc la possibilité de régler à volonté la consommation du glucose et par suite, d'accélérer les processus d'incorporation des ions PO_4^{---} intracellulaires dans les Ph^o dérivés de la glycolyse.

L'influence de la concentration extracellulaire de bleu de méthylène sur la consommation d'oxygène (c'est l'effet le plus facile à suivre) n'a guère été précisée jusqu'alors : seul un travail de BRIN-YONEMOTO (29) donne une indication. Nous avons d'abord déterminé l'influence de la concentration en colorant, à la fois sur la consommation d'oxygène (exprimée ici en Qo^2/ml* et sur la pénétration globale des ions PO_4^{---} extracellulaires.

---

* Le « quotient glycolytique » est le rapport :

$$\frac{\mu \text{ Mol. Lactate formé}}{\mu \text{ Mol (glucose consommé)}} \times 2$$

Sa valeur normale 1 indique qu'une molécule de glucose est transformée en 2 molécules de lactate : donc, que tout le glucose emprunte la voie d'EMBDEN-MEYERHOF. En réalité, dans le globule rouge, 10 % environ du glucose échappent à cette voie et sont directement oxydés dans le shunt des pentoses.

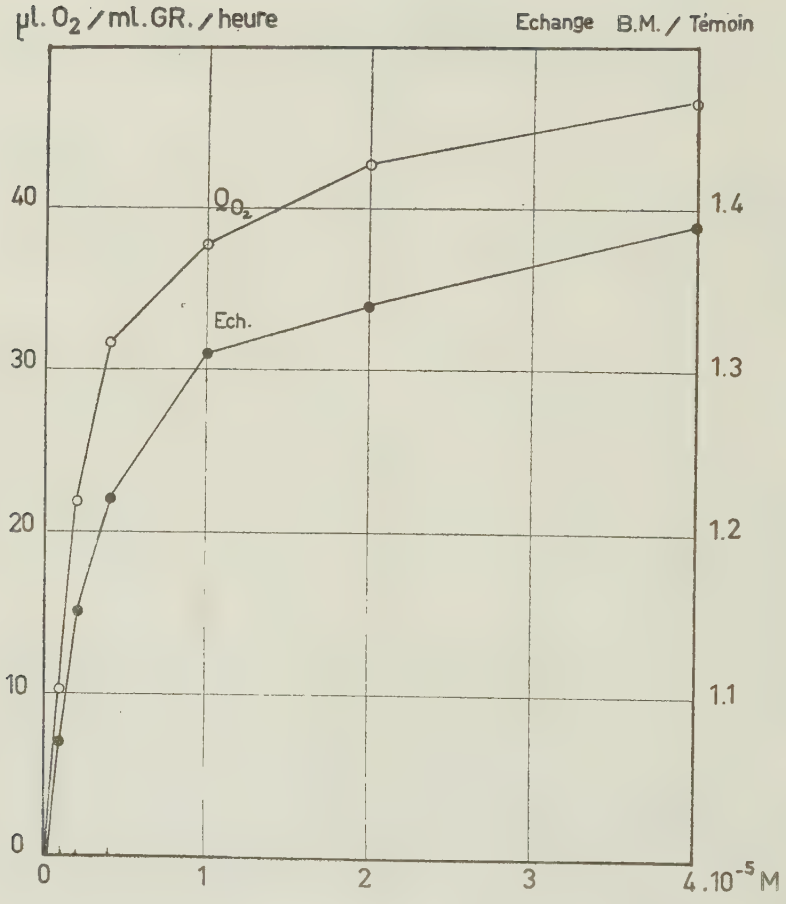


FIG. 39

Influence de la concentration en bleu de méthylène sur la consommation d'oxygène et sur la pénétration globale des ions PO_4--- intracellulaires

La figure 39 rassemble les résultats : elle montre que la consommation d'oxygène est déjà nettement accrue pour de très faibles concentrations en bleu de méthylène (de l'ordre de 1.10^{-6} M), et que la courbe s'infléchit assez rapidement. A partir de 1.10^{-5} M, le phénomène se ralentit fortement.

L'influence du colorant sur la pénétration de PO_4^{---} (E) est exprimée ici en pourcentage par rapport au globule témoin (sans bleu de méthylène) : la présence de bleu de méthylène augmente la pénétration des ions phosphates à travers la membrane, et la courbe est sensiblement parallèle à celle de consommation d'oxygène.

Ces essais préliminaires indiquent que le bleu de méthylène influence la perméabilité aux ions PO_4^{---} et que l'étude du phénomène est surtout intéressante dans la partie initiale, fortement ascendante de la courbe c'est-à-dire dans des concentrations comprises entre 1.10^{-6} M et 1.10^{-5} M. C'est dans ces limites que nous avons établi la répartition du ^{32}P dans les deux compartiments intracellulaires.

Le tableau XXXIX indique la répartition du phosphore intracellulaire après une incubation d'une heure à 37° en milieu de KREBS phosphate (à 2 µmoles P/ml) glucosé (1 mg/ml).

Le bleu de méthylène diminue la concentration des orthophosphates libres de la cellule : MAIZELS (150) avait déjà constaté cet effet et l'interprétait comme le résultat de l'inhibition de l'hydrolyse des esters phosphoriques.

Inversement, le bleu de méthylène provoque une accumulation des phosphodérivés non nucléotidiques, ce qui pourrait être également en faveur de l'hypothèse de MAIZELS. En réalité, une explication plus logique est fournie par une étude simultanée de la glycolyse. Le colorant, en favorisant le shunt, déplace l'équilibre entre les deux compartiments intracellulaires en faveur des fractions organiques. Il convient d'ailleurs de noter que la concentration des trois nucléotides adényliques reste constante et que leurs activités spécifiques ne varient pas de manière sensible.

Autrement dit, en introduisant un accepteur artificiel d'électrons qui ne touche pas la voie glycolytique normale d'EMBDEN-MEYERHOF, nous accélérons le shunt des hexoses monophosphates. Cette voie des pentoses n'a pratiquement aucune influence sur la recharge de l'ATP (et l'équilibre des nucléotides adényliques n'est pas modifié), mais elle entraîne une accumulation importante de Ph^o dérivés.

Dans le tableau XL, la répartition du ^{32}P incorporé dans la cellule est exprimée pour chaque fraction en pourcentage du ^{32}P intracellulaire (pour deux concentrations en bleu de méthylène très faibles comprises dans la partie ascendante de la courbe 39).

Deux faits ressortent nettement de la comparaison avec le témoin :

— l'équilibre des nucléotides adényliques (dépendant essentiellement de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF) n'est pas modifié.

TABLEAU XXXIX

Répartition des composés phosphorés intracellulaires du globule rouge humain en présence de bleu de méthylène
(Après incubation d'une heure à 37°
en milieu KREBS-phosphate-glucosé)

Bleu de Méthylène	P en µMoles/ml de globules rouges						
	PO_4	Esters	ATP	ADP	AMP	Somme des nucléotides	P total
0	1,75	5,20	0,70	0,24	0,08	1,02	9,61
1.10^{-6} M	1,62	5,54	0,65	0,26	0,06	0,97	9,69
2.10^{-6} M	1,58	5,62	0,70	0,23	0,09	1,02	9,85
4.10^{-6} M	1,50	5,58	0,67	0,24	0,06	0,97	9,90
1.10^{-5} M	1,42	6,30	0,71	0,21	0,07	0,99	10,34

TABLEAU XL

Répartition du ^{32}P incorporé dans les composés phosphorés intracellulaires en présence de bleu de méthylène

Bleu de méthylène	Répartition en % du ^{32}P (I)						
	P (PO_4)	P organique	Esters	ATP	ADP	AMP	Somme des nucléotides
0	35,1	64,9	38,7	21,0	6,0	0,2	27,2
0	35,1	64,9	37,7	21,0	6,0	0,2	27,2
1.10^{-6}M	34,3	65,7	39,4	19,0	6,1	0,3	26,3
4.10^{-6}M	29,8	70,2	44,3	18,0	6,6	0,4	25,9

— l'équilibre entre le compartiment minéral et les esters phosphoriques est déplacé : le premier incorpore moins, le second, au contraire, accumule le ^{32}P.

Envisageons le problème sous l'angle de la répartition du $^{32}P(E)$ entre les deux fractions intracellulaires : nous obtenons avec le bleu de méthylène une modification de l'équilibre normal de répartition inverse de celle observée en présence d'inhibiteurs de la glycolyse. En d'autres termes, le bleu de méthylène favorise l'entrée des ions PO_4^{---} (I) dans les dérivés organiques. L'effet sur la cinétique d'incorporation globale doit être également inversé. C'est ce que nous avons constaté effectivement : en accumulant du P minéral, les inhibiteurs ralentissent l'entrée globale, alors que le bleu de méthylène l'accélère en abaissant la concentration de PO_4^{---} (I).

DISCUSSION

Dans ce travail, où nous avons tenté de définir le mécanisme de l'entrée des ions PO_4^{---} dans le globule rouge humain, nous nous trouvions devant trois hypothèses de transport :

— soit diffusion simple,

— soit diffusion facilitée,

— soit transport actif.

Pour discuter nos résultats, nous envisagerons d'abord les raisons qui nous conduisent à éliminer les hypothèses d'une diffusion facilitée et d'un transport actif, et nous développerons ensuite l'ensemble des arguments positifs qui démontrent que le passage des orthophosphates à travers la membrane du globule rouge se fait par simple diffusion, c'est-à-dire par un mécanisme analogue à celui qui préside à l'entrée des autres anions dans la cellule.

1. La diffusion facilitée :

Ce mode de pénétration, qui fait intervenir l'action d'un transporteur au niveau de la membrane, a été particulièrement bien défini dans le cas des oses. Sa cinétique traduit l'existence d'une combinaison transitoire analogue à celle qui régit l'activité enzymatique, c'est-à-dire :

— La vitesse de pénétration n'est proportionnelle à la concentration extra-cellulaire que dans la limite où la capacité de saturation du transporteur n'est pas dépassée. Aux fortes concentrations, la droite s'infléchit vers l'horizontale et une constante analogue à celle de MICHAELIS-MENTEN des enzymes définit l'affinité du site transporteur pour le composé transporté.

— L'entrée de l'ion dans la cellule peut être freinée par l'entrée simultanée d'un ion présentant une analogie de structure suffisante pour qu'il puisse provoquer un effet de compétition au niveau du site transporteur.

Aucun de ces deux critères ne se vérifie : le flux des ions PO_4^{---} est non seulement proportionnel à la concentration extra-cellulaire, même lorsque le milieu est surchargé en orthophosphates (comme VESTERGAARD-BOGIND (234) l'a d'ailleurs constaté), mais les ions dont on pouvait espérer un effet de compétition (SO_4^{--}, AsO_4^{---}) sont sans action directe sur la vitesse d'entrée. L'hypothèse d'une diffusion facilitée paraît donc devoir être exclue.

2. Le transport actif :

Rappelons d'abord que ce mode de transport intervient habituellement dans les cas où un gradient de potentiel électrochimique négatif rend indispensable un couplage énergétique pour remonter le courant créé par la différence de concentration de part et d'autre de la membrane. Dans le cas du globule rouge humain, la nécessité d'un transport actif n'apparaît pas puisque, dans les conditions physiologiques, la concentration intracellulaire en orthophosphates est inférieure à celle du milieu plasmatique.

Le transport actif suppose un couplage énergétique. Pratiquement, dans le globule rouge, la glycolyse représente la seule source d'énergie. Toutefois, nous discuterons également la participation éventuelle d'autres métabolismes qui ont été dans d'autres tissus associés au transport actif.

a) Le transport actif de PO_4^{---} est lié a la glycolyse :

C'est là l'hypothèse la plus généralement invoquée. Si elle se vérifie, elle doit entraîner deux conséquences :

— l'intensité de la glycolyse modifie la vitesse d'entrée des ions orthophosphates.

— les ions PO_4^{---} extra-cellulaires sont d'abord incorporés dans un phosphodérivé intermédiaire formé au cours de la glycolyse, et PO_4 n'est libéré que secondairement dans le milieu intracellulaire par hydrolyse phosphatasique.

Donc, l'activité spécifique du précurseur qui apparaît doit être supérieure à celle des ions orthophosphates intracellulaires.

Nous croyons avoir démontré, par les résultats de notre travail, que l'intensité de la glycolyse ne modifie pas la vitesse d'entrée des ions orthophosphates dans le globule :

— modification du niveau de la glycémie,

— perturbation de l'équilibre de dégradation (en faisant varier le pH du milieu),

— ralentissement de la glycolyse par des inhibiteurs spécifiques,

— dérivation d'une partie importante de la glycolyse normale vers une voie habituellement accessoire, par le bleu de méthylène ; dans tous ces cas, la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans la fraction orthophosphate intracellulaire n'est pas modifiée.

Toutefois, dans certaines expériences, l'interprétation est délicate, et plusieurs travaux anciens, où la répartition intracellulaire du ^{32}P n'avait pas été établie, ont pu conduire à des conclusions erronées. En particulier, nous constatons qu'en présence de mono-iodacétate, l'incorporation globale est diminuée, ce que GOURLEY (88), PRANKERD et ALTMAN (188) avaient déjà souligné ; et ils avaient conclu que l'entrée de PO_4^{---} est associée à la glycolyse. En réalité, en suivant la répartition du ^{32}P dans la

cellule, on constate que cette entrée globale est diminuée : l'incorporation dans les fractions organiques (esters et dérivés adényliques) est abolie avec la glycolyse, mais l'incorporation dans la fraction orthophosphate est accrue. Et pour cette dernière, même en présence d'inhibiteurs (MIA ou fluorure), la cinétique répond aux lois d'une diffusion simple : la courbe 36 traduit cette proportionnalité entre le flux des ions PO_4^{---} à travers la membrane et la concentration extra-cellulaire *.

L'influence du pH sur la glycolyse et sur l'entrée des ions PO_4^{---} est également complexe. On sait que la glycolyse du globule est maximum à un pH voisin de 8,0 et qu'elle diminue très rapidement lorsque le pH s'abaisse (CHAPMAN) (43) (44), MURPHY (166), RUMMEL (208). Dans nos expériences, c'est au pH favorisant la glycolyse que l'incorporation globale est la plus intense : on pourrait donc en conclure que les deux phénomènes sont directement liés. Mais l'analyse complète de la répartition du ^{32}P montre qu'il n'en est rien : en stimulant la glycolyse, nous favorisons l'incorporation dans les fractions organiques et diminuons la concentration de la fraction minérale, donc facilitons l'entrée dans la cellule en déplaçant le gradient de concentration. La glycolyse n'a ici qu'une action indirecte. D'ailleurs, en milieu acide, c'est-à-dire dans une zone de pH où la glycolyse est très faible, l'activité spécifique élevée de PO_4^{---} intracellulaire témoigne d'une entrée par diffusion simple : l'entrée est maximum lorsque la glycolyse est nulle, comme RUMMEL l'avait d'ailleurs déjà souligné (208).

Il y a plusieurs explications possibles à cette influence du pH sur la perméabilité :

— une modification de l'équilibre de DONNAN : la dissociation de l'hémoglobine est modifiée en fonction du pH et son abaissement au-dessous du point isoélectrique (6,8), en diminuant son équivalence anionique, favoriserait l'entrée des ions PO_4^{---}. L'entrée des ions SO_4^{--} répond d'ailleurs à une influence identique du pH (202).

Une modification de l'équilibre entre les deux formes $PO_4H_2^-$ et PO_4H^{--} (pK = 6,70), les variations de pH entraînant un changement dans les concentrations relatives. VESTERGAARD-BOGIND (234) signale d'ailleurs qu'à pH 7,0 les orthophosphates pénètrent plus rapidement (T 1/2 = 50 minutes) qu'à pH 7,5 (T 1/2 = 150 minutes) et conclut que la membrane doit être plus perméable à la forme $PO_4\ H_2^-$.

Dans l'hypothèse d'un transport actif, un phosphodérivé intermédiaire (associé à une chaîne métabolique, la glycolyse par exemple) se forme aux dépens des ions PO_4^{---} extra-cellulaires au niveau de la face externe de la membrane, pour se scinder à la face interne, en libérant PO_4 dans le

---

* Cette indépendance de l'entrée des ions PO_4^{---} vis-à-vis du métabolisme glucidique a été retrouvée avec des globules rouges nucléés d'oiseaux, qui tirent leur énergie de processus oxydatifs : les inhibiteurs de respiration ou les agents découplants (DNP) n'affectent pas le transit de PO_4^{---} (93).

milieu intracellulaire : un tel transporteur devrait avoir une vitesse de renouvellement importante et surtout accuser une activité spécifique élevée, supérieure à celle des autres phosphodérivés intracellulaires.

Au contraire, dans le cas d'une diffusion simple, l'ion PO_4^{---} traverse directement la membrane. Si nous le marquons, c'est lui que nous devons retrouver dans la cellule avec d'emblée l'activité spécifique la plus élevée. Secondairement, la glycolyse dilue ce $^{32}PO_4$ dans les phosphodérivés et l'activité spécifique de ceux-ci croît alors progressivement.

Ce brassage du ^{32}P à l'intérieur de la cellule est très rapide. Il n'est donc pas surprenant de relever de nombreuses divergences sur l'ordre du marquage, surtout dans les expériences où l'incubation du globule est prolongée. En effet, il n'est possible de saisir la forme sous laquelle le ^{32}P entre dans la cellule que si l'analyse porte sur des durées d'incubation très courtes : on évite ainsi la répartition secondaire du ^{32}P sous l'influence de la glycolyse, qui tend à égaliser les activités spécifiques.

Pour PRANKERD (188), le premier composé marqué serait le 2-3-DPG. C'est certainement le résultat le plus paradoxal : d'une part, parce qu'il est impossible d'expliquer par les notions métaboliques classiques que le 2-3-DPG puisse incorporer le ^{32}P (E) avant tout autre phosphodérivé ; d'autre part, parce que ce résultat n'a jamais été confirmé, pas même par PRANKERD, qui a tenté ultérieurement une explication peu convaincante de ce qui n'est sans doute qu'une erreur technique.

Plus intéressants sont les résultats qui indiquent que l'ATP est le premier composé marqué (90) (82) (10) (138) (224) et qui concluent que c'est par une phosphorylation de l'ADP au niveau de la membrane que le $^{32}PO_4^{---}$ entrerait dans la cellule. Cette hypothèse impliquerait évidemment l'intervention d'un transport actif, d'un couplage avec la glycolyse. Dans toutes nos expériences, l'activité spécifique des ions orthophosphates intracellulaires est toujours supérieure à celle de l'ATP ou de l'ADP et, a fortiori, à celle des esters phosphoriques de la glycolyse séparés par chromatographie, écart d'autant plus net que les durées d'incubation des globules étaient plus brèves.

On pourrait évidemment imaginer qu'une telle combinaison très fugace se forme au niveau de la membrane et qu'elle s'hydrolyse en libérant des ions PO_4^{---} sur la face interne. Combinaison très instable et en concentration trop faible pour être décelée par nos moyens analytiques. Mais nous devrions alors retrouver les caractéristiques cinétiques d'un transport facilité, ce qui n'est pas le cas.

b) **Le transport actif est associé à un autre métabolisme :**

Cette hypothèse apparaît déjà moins défendable, puisque le globule rouge humain est dépourvu de synthèse protéique et que son activité de synthèse des lipides est très limitée. Toutefois, en raison de leur validité démontrée dans d'autres domaines, nous ne devons pas écarter a priori

soit l'hypothèse d'un cycle phosphatidique (HOKIN et HOKIN (112)), soit celle d'une combinaison phosphoprotéique (JUDAH et AHMED (121)). Ces deux types de combinaison étant limités au stroma, c'est à ce niveau que nous avons cherché à mettre en évidence un phosphodérivé rapidement formé lorsqu'on incube le globule en présence de $^{32}PO_4^{---}$, et atteignant d'emblée l'activité spécifique la plus élevée.

Ces expériences sortent du domaine technique que nous avons exploré et d'autre part elles ne constituent qu'une vérification accessoire : c'est pourquoi nous ne les avons pas détaillées dans le chapitre précédent. Mais nous avons vérifié (en particulier sur des incubations de courte durée) que ni les phospholipides (et plus particulièrement les acides phosphatidiques), ni les phosphoprotéines (et plus spécialement la phosphorylsérine) n'incorporent le ^{32}P avec une vitesse et une intensité compatibles avec leur participation au transport actif des orthophosphates.

3. **La diffusion simple :**

Après avoir rassemblé ces faisceaux d'arguments négatifs, éliminant les deux précédentes hypothèses, il nous faut maintenant établir que les ions PO_4^{---} traversent la membrane du globule rouge par une simple diffusion. Nous venons d'insister sur un fait : le premier composé marqué que nous puissions déceler à l'intérieur de la cellule est l'ion orthophosphate. De plus la cinétique de l'entrée correspond aux lois de la diffusion.

La courbe de pénétration des ions PO_4^{---} en fonction du temps d'incubation traduit une réaction d'ordre 1 : la vitesse est, à tout instant, proportionnelle à la concentration extra-cellulaire restante. C'est d'ailleurs là une notion classique qui a reçu des interprétations diverses :

— De nombreux auteurs (GOURLEY et GEMMILL (87), PRANKERD et ALTMAN (188), MUELLER et HASTINGS (164), y voient une preuve de l'entrée active directement liée au métabolisme cellulaire, l'activité glycolytique étant supposée parfaitement uniforme pendant toute la durée de l'incubation.

— GOURLEY et MATSCHINER (91) ont trouvé que, dans des temps très courts d'incubation, la cinétique d'entrée correspond à la superposition de deux mécanismes : la courbe (en coordonnées semi-logarithmiques) est figurée par deux segments de droite, traduisant d'une part une diffusion simple rapide (de T 1/2 = 8 minutes), et, d'autre part, un transport actif, relativement lent (de T 1/2 = 280 minutes). Nous n'avons jamais constaté l'angulation rapportée par ces auteurs, dans les multiples expériences où la phase initiale de l'incorporation a été analysée.

— La lenteur de l'entrée des ions PO_4^{---} dans le globule rouge humain (T 1/2 = 140 minutes, à 37°) a été parfois un argument pour opposer son mécanisme à la diffusion rapide des ions Cl^- par exemple (T 1/2 = 0,2 sec.). Il est établi actuellement que la diffusion anionique se fait à travers les pores de la membrane, et que sa vitesse est déterminée à la fois par le rayon

des pores et par le rayon des ions. SOLOMON (217), qui le premier a fourni une mesure précise des pores du globule, estime que les différences de vitesse de pénétration des ions Cl^- et CO_3H^- sont uniquement dues à leurs rayons. D'ailleurs, l'ion SO_4^{--}, dont la pénétration par diffusion simple paraît démontrée, pénètre beaucoup plus lentement que les précédents (T 1/2 = 80 minutes) : son rayon, si l'on se rapporte aux valeurs rassemblées par HARRIS (104), est du même ordre de grandeur que celui des ions PO_4^{---}.

Le flux de PO_4^{---} à travers la membrane est proportionnel au gradient de potentiel électrochimique, c'est-à-dire à la concentration du milieu extra-cellulaire. La cinétique de l'entrée des ions PO_4^{---} n'est pas affectée par une augmentation de la concentration extra-cellulaire dépassant dix fois la concentration physiologique. PO_4^{---} qui pénètre dans la cellule représente une proportion constante du PO_4 (E).

Pour chaque concentration en P (E), un équilibre apparaît entre P (E) et P (I), dont la cinétique a été établie. Nos résultats sont en accord avec ceux qui ont été précédemment publiés (234) : cet équilibre est atteint à 37° en moins de trois heures. Toutefois, pour éviter une altération de la membrane que nous avons parfois observée dans des incubations prolongées, (se traduisant par une hémolyse plus ou moins discrète) et compte tenu de l'aspect de la courbe d'incorporation en fonction du temps d'incubation, nous pouvons admettre que le phénomène est pratiquement équilibré au bout de 120 minutes.

Quel est le niveau de cet équilibre et sa signification ? Nos expériences nous ont montré que les ions PO_4^{---} extra-cellulaires pénètrent dans la cellule sous leur forme ionique, sans participation d'un transporteur ou d'un phosphodérivé intermédiaire. L'étude de la cinétique d'incorporation dans les diverses fractions intracellulaires précise le schéma général de l'équilibre de répartition :

$$P\ (PO_4)\ E \rightleftharpoons P\ (PO_4)\ I \rightleftharpoons Porg\ (I)$$

Les phosphodérivés organiques ne traversant pas la membrane cellulaire, la diffusion se fait exclusivement aux dépens des ions PO_4^{---}, et l'équilibre de répartition de ces ions de part et d'autre de la membrane est réglé par la loi de GIBBS-DONNAN, c'est-à-dire que le rapport des activités des ions diffusibles répond à :

$$\frac{Cl^-(I)}{Cl^-(E)} = \frac{CO_3H^-(I)}{CO_3H^-(E)} = \frac{PO_4H_2^-(I)}{PO_4H_2^-(E)} = \sqrt{\frac{POH_4^{--}(I)}{PO^4H^{--}(E)}}$$

Dans la figure 40, nous avons représenté l'équilibre des ions PO_4^{---} tel qu'il s'établit de part et d'autre de la membrane, lorsqu'on fait varier la concentration du milieu extra-cellulaire en PO_4^{---}. Sur la même figure, nous avons également représenté l'équilibre très différent obtenu en inhibant l'incorporation secondaire dans les dérivés de la glycolyse par le mono-iodacétate.

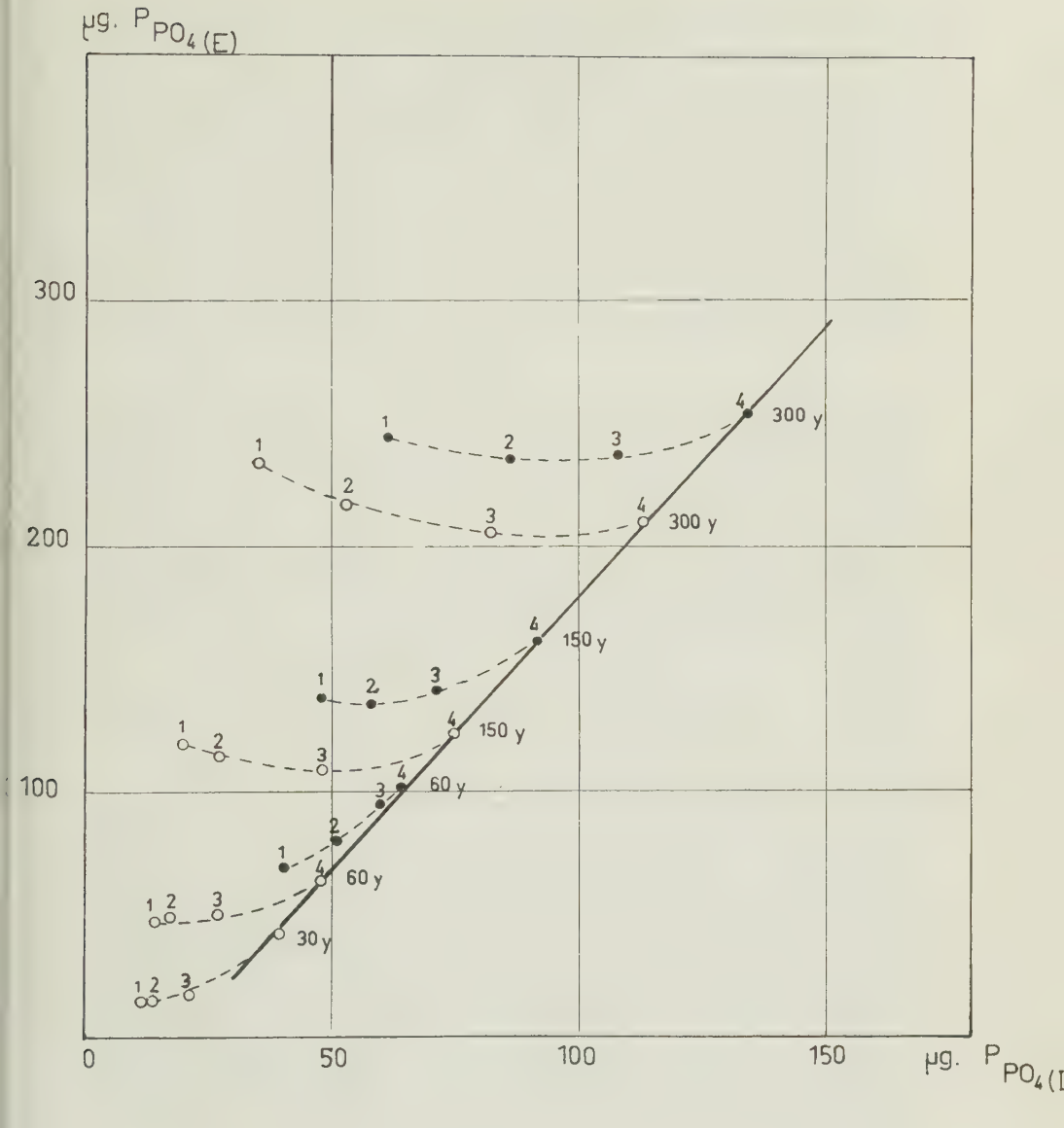


FIG. 40

Equilibre de répartition PO_4 intracellulaire/PO_4 extracellulaire en fonction de la concentration en PO_4 extracellulaire

(1 = 15 min./2 = 30 min./3 = 60 min./4 = 120 min.)

...O...O... sans monoiodacétate

...●...●... avec monoiodacétate

A l'équilibre, les points s'alignent sur une droite, quelle que soit la concentration extra-cellulaire initiale et que l'incorporation dans le compartiment organique soit intense ou non.

Dans cette représentation, obtenue dans des conditions expérimentales très différentes, nous retrouvons la caractéristique la plus démonstrative d'un processus de diffusion : la proportionnalité entre le flux d'entrée et le gradient de potentiel électrochimique. A l'équilibre, la répartition des ions diffusibles de chaque côté de la membrane est réglée par la loi de GIBBS-DONNAN : nous avons calculé, à partir des valeurs de la droite précédente le rapport de répartition. Celui des ions Cl^- (ou CO_3H^-) ayant été déterminé avec précision par des travaux antérieurs (232) (194) (76), la confrontation des rapports doit permettre de décider si la répartition des ions PO_4^{---} répond à la même loi.

Nous avons corrigé chaque valeur de la concentration intracellulaire en l'exprimant en m Moles par kg d'eau. Nous avons pour cela déterminé la teneur moyenne en eau des globules rouges humains, et la valeur que nous avons obtenue (65,0 %) est très proche de celles de FITZSIMONS et SENDROY (64,4 %) (76) et de VESTERGAARD-BOGIN et HASSELBO (64,7 %) (233).

Pour les valeurs de l'équilibre qui délimitent la droite de la figure 40, nous avons calculé le rapport de GIBBS-DONNAN en considérant les deux dissociations possibles au pH physiologique :

$$\frac{(PO_4H_2^-)\ I}{(PO_4H_2^-)\ E} \quad \text{et} \quad \sqrt{\frac{(PO_4H^{--})\ I}{(PO_4H^{--})\ E}}$$

Le premier de ces rapports a une valeur de 0,71 ($\pm$ 0,01), le second une valeur plus élevée : 0,84 ($\pm$ 0,01).

Si nous adoptons pour valeurs du rapport $\frac{(Cl^-)\ I}{(Cl^-)\ E}$ caractéristique de l'équilibre de GIBBS-DONNAN, celles récemment publiées par FITZSIMONS et SENDROY (76), 0,678 (pour Hb sous forme oxygénée) et 0,728 (pour Hb sous sa forme réduite), nous constatons que le rapport exprimé à partir du phosphate monométallique répond le mieux à l'équilibre théorique, alors que l'autre s'en écarte notablement. Il semblerait donc que l'échange des ions orthophosphates à travers la membrane et l'équilibre s'établissent sous la forme d'ions monométalliques $PO_4H_2^-$ * Cette observation confirme les résultats que nous avons précédemment soulignés : à savoir que l'entrée des ions orthophosphates dans le globule est favorisée à un pH inférieur au pH physiologique, donc dans la zone acide où la dissociation $PO_4H_2^-$ prédomine.

---

* Récemment, CLARKSON et ses collaborateurs (49) ont montré que l'ion orthophosphate est transporté à travers la muqueuse intestinale sous sa forme monométallique $PO_4H_2^-$.

Nous avons souligné, en particulier dans les incubations de courte durée, que la droite d'incorporation dans la fraction orthophosphates intracellulaire en fonction du temps ne raccorde pas à l'origine, contrairement à celle des esters et des dérivés adényliques. Par ailleurs, la diffusion simple d'un ion se fait toujours dans le sens du gradient de concentration ; dans les conditions physiologiques du globule rouge, cette condition est respectée, et nous avons établi qu'en augmentant le gradient, on accroît l'entrée dans la cellule.

Mais nous avons également constaté que, lorsqu'on replace des globules rouges lavés dans un milieu salin isotonique (KCl iso) ne renfermant que des traces de $^{32}PO_4$, la cinétique de l'entrée répond aux mêmes caractéristiques que précédemment : bien que le sens du gradient de concentration soit ici inversé, l'entrée des ions orthophosphates dans la cellule répond aux critères d'une simple diffusion.

Nous avons étudié cet aspect du problème de la perméabilité en milieu pauvre en orthophosphates et nos conclusions confirment celles qu'ont formulées CARTIER et TEMKINE (42) : lorsque le milieu isotonique ne renferme que des traces de $^{32}PO_4^{---}$, la membrane fixe instantanément une fraction importante du ^{32}P. La nature de cette combinaison a été étudiée : elle ne correspond ni à un phospholipide, ni à une fraction phosphosérine (libre ou liée) (ce qui confirme l'absence de transport actif associé à ces deux métabolites), mais elle conserve les caractères des orthophosphates : il s'agirait d'un phénomène d'adsorption sur la surface de la membrane, créant localement une surconcentration en orthophosphates. C'est cette concentration de PO_4^{---} en surface qui définirait la valeur du gradient de concentration, et c'est cette fraction que nous révèlent les courbes de cinétique figures 15 et 18.

La valeur du gradient de concentration serait définie non seulement par cette surconcentration locale créée sur la surface externe de la membrane, mais sans doute également par une inégalité de répartition des orthophosphates à l'intérieur du G.R. qu'on ne peut estimer actuellement.

Il est probable en effet que les enzymes ne sont pas répartis d'une manière uniforme dans l'intérieur de la cellule. Le PO_4 incorporé dans la fraction organique doit être à concentration plus élevée au voisinage des systèmes enzymatiques de la glycolyse. De même le P minéral libéré des composés phosphorés organiques par les phosphatases n'est pas immédiatement également réparti. La concentration du PO_4 (I) au voisinage de la membrane est sensible à cette inégale répartition.

CONCLUSIONS

Ce travail est consacré à l'étude des mécanismes de la perméabilité du globule rouge humain aux ions orthophosphates.

Dans une **PREMIÈRE PARTIE**, nous avons rappelé :

1. La composition chimique et la structure de la membrane du globule rouge humain normal.

2. La composition du milieu intracellulaire, caractérisé avant tout par une concentration exceptionnellement élevée d'hémoglobine.

3. L'équilibre de répartition des ions entre le milieu extra-cellulaire et le contenu globulaire, auquel la présence de l'hémoglobine, anion non diffusible et dont la dissociation varie avec le degré d'oxygénation, imprime les conditions de la loi de GIBBS-DONNAN.

L'équilibre des ions orthophosphates est plus délicat à définir que celui des autres anions, car le phosphore se répartit entre deux compartiments intracellulaires, l'un minéral (PO_4^{---}), l'autre organique (phosphodérivés de la glycolyse et dérivés phosphorylés des nucléosides). Le niveau intracellulaire des ions PO_4^{---} reflète un double équilibre :

— d'une part, entre les orthophosphates intra- et extra-cellulaires ;

— d'autre part, entre les compartiments minéraux et organiques intra-globulaires.

Après avoir rappelé les mécanismes possibles du passage des ions PO_4^{---} à travers la membrane :

— soit DIFFUSION SIMPLE, analogue à celle qui règle l'équilibre des autres anions ;

— soit DIFFUSION FACILITÉE, par l'interposition d'un transporteur, comme dans le cas des oses ;

— soit enfin TRANSPORT ACTIF, dont l'énergie est fournie par l'activité métabolique de la cellule, tel qu'il a été démontré pour le sodium et le potassium ;

nous avons présenté les multiples théories qui ont été proposées pour expliquer le passage des ions PO_4^{---} dans le globule rouge. Généralement influencées par la participation des ions aux réactions de la glycolyse, elles associent le plus souvent les phosphodérivés de la voie d'EMBDEN-MEYERHOF à un transport actif.

L'objet de ce travail a été d'établir par le marquage isotopique, à l'aide du ^{32}P, les caractéristiques cinétiques de la perméabilité, en recherchant plus spécialement sous quelle forme apparaît d'abord le radiophosphore dans la cellule, pour les durées d'incubation très courtes. A partir des indications fournies par la cinétique d'entrée, nous avons successivement cherché à identifier les caractéristiques :

— soit d'une diffusion facilitée ;

— soit d'un transport actif.

Dans la **SECONDE PARTIE**, nous avons détaillé et discuté la validité et la reproductibilité des techniques analytiques employées pour déterminer la concentration des phosphodérivés et la vitesse d'incorporation du ^{32}P. Ce chapitre précise :

— les conditions d'incubation ;

— l'extraction de la fraction acido-soluble ;

— la séparation des trois groupes de dérivés :

  — orthophosphates ;

  — esters phosphoriques ;

  — nucléotides adényliques ;

— dans chaque groupe, les composants ont été eux-mêmes séparés (par chromatographie sur papier ou sur colonne de DOWEX 1), dosés, et leur activité spécifique a été mesurée.

Dans la **TROISIÈME PARTIE** qui rassemble nos résultats expérimentaux, nous avons d'abord précisé les limites des deux compartiments intracellulaires :

— la **fraction minérale (P (PO_4))** varie selon les auteurs dans des limites anormalement dispersées. Nous avons établi qu'elle est très influencée par les conditions de prélèvement et la nature de l'anticoagulant. L'héparine modifie peu la concentration en orthophosphates du globule : celle-ci (10 à 15 µg par ml) est inférieure à celle du plasma (25 à 40 µg par ml) et elle représente environ 2 pour cent du P-acido-soluble intracellulaire ;

— la **fraction organique (P organ.)** représente normalement près de 98 pour cent du P acido-soluble. Nous avons établi la répartition et les variations des intermédiaires de la glycolyse et des dérivés adényliques.

Cette étude préliminaire précise un élément important de la discussion du mécanisme de la perméabilité : dans les conditions physiologiques, le passage des ions PO_4^{---} du milieu extra-cellulaire vers le globule se fait dans le sens du gradient de potentiel électrochimique.

Nous avons ensuite établi la cinétique de l'entrée des ions orthophosphates :

— l'entrée dans le globule répond à une réaction d'ordre 1 et la durée de demi-renouvellement est d'environ 140 minutes ;

— dans la phase initiale d'incorporation (pour des durées d'incubation comprises entre 0 et 300 secondes), l'apparition du ^{32}P dans la cellule débute immédiatement et croît linéairement avec la durée ;

— la vitesse d'entrée est influencée par la température, et l'énergie d'activation (mesurée entre 30° et 40°) légèrement variable selon la composition du milieu est de l'ordre de 20.000 calories.

Déterminé d'après les courbes d'incorporation en fonction du temps d'incubation, l'ordre d'apparition du ^{32}P dans les phosphodérivés fournit une indication précise sur le mécanisme de l'entrée des ions : c'est la fraction orthophosphates qui présente d'emblée l'activité spécifique la plus élevée, les dérivés adényliques (ATP et ADP) se marquant plus lentement et la fraction esters en dernier lieu.

Les données cinétiques sont en faveur d'une **DIFFUSION SIMPLE**. Mais elles n'excluent pas cependant la possibilité que les orthophosphates (intensément marqués) puissent provenir de l'hydrolyse d'une combinaison fugace réalisée dans la membrane ; difficilement décelable par nos moyens analytiques, ce processus correspondrait soit à une diffusion facilitée, soit à un transport actif.

Les expériences suivantes permettent d'exclure :

I. **Une diffusion facilitée :**

car les critères de ce mode de transport font défaut.

— **Absence d'effet de saturation** du site de transport : en faisant varier la concentration extracellulaire en PO_4^{---}, dans de très larges limites, le flux à travers la membrane est proportionnel à la concentration, même pour des concentrations dix fois supérieures aux limites physiologiques. Déterminée selon la représentation de LINEWEAVER-BURK, la constante d'affinité du site actif vis-à-vis des ions PO_4^{---} est nulle : autrement dit, il n'existe pas de site actif intervenant dans le transport des ions PO_4^{---}.

— **Absence d'effet de compétition :** la cinétique de la perméabilité n'est modifiée :

— ni par des concentrations croissantes extra-cellulaires en ions SO_4^{--} ;

— ni par des concentrations croissantes en ions AsO_4^{---} : dans ce dernier cas, nous démontrons que le faible ralentissement constaté est la conséquence d'une modification de l'équilibre de répartition du P entre les deux compartiments intracellulaires, l'ion arséniate freinant l'incorporation dans les phosphodérivés de la glycolyse.

II. **Un transport actif :**

Le caractère « passif » de l'entrée des ions PO_4^{---} est attesté par l'absence de liaison avec les réactions de la glycolyse. Nous avons déterminé les modifications de l'échange global ^{32}P extra/^{32}P intracellulaire et la cinétique de l'incorporation entre les deux compartiments, en faisant varier l'intensité de la glycolyse :

— soit en incubant les globules en présence de concentrations en glucose variant entre 0 et 1 500 µg par ml ;

— soit en modifiant l'intensité de la glycolyse par variation du pH d'incubation entre 6,0 et 8,6 : l'activité glycolytique est très sensible à ces variations qui ne modifient l'entrée des ions PO_4^{---} que dans la mesure où la répartition entre les deux compartiments est profondément affectée. En particulier, c'est aux pH acides (où perméabilité et glycolyse sont les plus faibles) que l'incorporation du ^{32}P dans le P minéral intraglobulaire est la plus intense ;

— soit en inhibant la glycolyse par des effecteurs (monoiodacétate, fluorure, arséniate). Le monoiodacétate provoque le blocage le plus complet, les arséniates ont l'action la plus nuancée : mais dans les trois cas, les résultats sont comparables : la pénétration est ralentie, quelle que soit la concentration extérieure en PO_4^{---} et la cinétique demeure celle d'une diffusion simple, le flux étant proportionnel au gradient de concentration. La présence d'inhibiteur accumule le ^{32}P dans la fraction minérale intracellulaire, alors que l'incorporation dans les esters est bloquée et que la recharge de l'ATP (et de l'ADP) est pratiquement arrêtée ;

— soit enfin, en déviant la voie glycolytique normalement prépondérante. En présence de bleu de méthylène, l'oxydation directe du glucose par la voie des pentoses phosphates accroît très fortement la glycolyse. L'entrée globale de PO_4^{---} est augmentée, mais cette action, inverse de celle qui est obtenue avec les inhibiteurs de la glycolyse, se traduit aussi par une répartition inverse du ^{32}P dans les fractions intracellulaires : le bleu de méthylène accroît le renouvellement des esters phosphoriques (sans d'ailleurs modifier notablement celui des nucléotides adényliques), qui se marquent plus rapidement.

L'ensemble de nos résultats démontre :

— d'une part que la cinétique de l'entrée des ions orthophosphates dans la cellule répond aux lois d'une diffusion simple ;

— d'autre part que les critères habituellement associés à une diffusion facilitée ou à un transport actif font défaut.

L'équilibre de part et d'autre de la membrane répond à la loi de GIBBS-DONNAN.

Dans la discussion, nous avons analysé les diverses théories successivement proposées, en cherchant moins à développer les travaux qui confirment nos résultats qu'à expliquer les divergences de ceux qui concluent à un autre mode de transport.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABOOD L.G., KOYAMA I., KIMIZUKA H. — Nature, 1963, **197**, 367
2. ALIVISATOS S.G.A., DENSTEDT O.F. — Science, 1951, **114**, 281.
3. ALIVISATOS S.G.A., KASHKET S., DENSTED O.F. — Canad. J. Biochem. Physiol. 1956, **34**, 46.
4. ALTMAN K.F., TABECHIAN H., YOUNG L.E. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, **75**, 142.
5. ALTMAN K.I. — Am. J. Med. 1959, **27**, 936.
6. AUDITORE J.V., HARTMANN R.C., COLE E.F. — J. Clin. Invest. 1959, **38**, 702.
7. BARRENSCHEEN H.E., VASARHELYI B. — Biochem. Z. 1931, **230**, 330.
8. BARRON E.J.G., HARROP G.A. — J. Biol. Chem. 1928, **79**, 65.
9. BARTLETT G.R., MARLOW A.A. — J. Lab. Clin. Med. 1953, **42**, 178.
10. BARTLETT G.R. — Ann. N.Y. Acad. Sci. 1958, **75**, 110.
11. BARTLETT G.R. — J. Biol. Chem. 1959, **234**, 449.
12. BARTLETT G.R. — J. Biol. Chem. 1959, **234**, 459.
13. BARTLETT G.R. — J. Biol. Chem. 1959, **234**, 466.
14. BAUDOUIN A., LEWIN J. — Bull. Soc. Chim. Biol. 1927, **9**, 280.
15. BAYER M. — Arch. Ges. Physiol. 1960, **270**, 323.
16. BERNSTEIN R.E. — J. Clin. Invest. 1959, **38**, 1572.
17. BERUNBLUM J., CHAIN E. — Biochem. J. 1938, **32**, 295.
18. BEUTLER E., ROBSON M., BUTTENWIESER E. — J. Clin. Invest., 1957, **36**,. 617.
19. BEUTLER E., YEH M.K.Y. — J. Lab. Clin. Med., 1959, **54**, 456.
20. BISHOP C., RANKINE D.M., TALBOTT. J.H. — J. Biol. Chem., 1959, **234**, 1233.
21. BISHOP C. — J. Biol. Chem., 1964, **239**, 1053.

22. BLANCHAER M.C., BALDWIN S.L. — J. Appl. Physiol., 1953, **6,** 8.

23. BLANCHAER M..C, BROWNSTONE S., WILLIAMS H.R. — Am. J. Physiol., 1955, **183,**, 95.

24. BLOMSTRAND R., NAKAYAMA F., NILSSON I.M. — J. Lab. Clin. Med., 1962, **59,** 771.

25. BOLINGBROKE V., MAIZELS. M — J. Physiol., 1959, **149,** 563.

26. BOOTH D.A. — Biochim. Biophys. Acta, 1963, **70,** 486.

27. BOSZORMENYI - NAGY I. — J. Biol. Chem., 1955, **212,** 495.

28. BREWER G.J., POWELL R.D. — Nature, 1963, **199,** 704.

29. BRIN M., YONEMOTO R.H. — J. Biol. Chem., 1958, **230,** 307.

30. BRUNS F.H. — Biochem. Z., 1954, **325,** 429.

31. BRUNS F.H., VAHLHAUS E. — Naturwis., 1956, **43,** 180.

32. BRUNS F.H., NOLTMANN - VAHLHAUS E. — Biochem. Z., 1958, **330,** 483.

33. BRUNS F.H., DUNWALD E., NOLTMANN E. — Biochem. Z., 1958, **330,** 497.

34. BUELL M.V. — J. Biol. Chem., 1923, **56,** 97.

35. CALVIN M., EVANS R.S., BEHRENDT V., CALVIN G. — Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1946, **61,** 416.

36. CARSON P.E., SCHRIER S.L., KELLERMEYER R.W. — Nature, 1959, **184,** 1292.

37. CARTA S., VIVALDI G. — Boll. Soc. Ital. Biol. sper., 1958, **33,** 1454.

38. CARTIER P., CHEDRU J., BAUDEQUIN P. — Bull. Sté Ch. Biol., 1959. **41,** 525.

39. CARTIER P., BOUCHARD M. — Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1963, **8,** 393.

40. CARTIER P., LEROUX J.P. — Ann. Biol. Clin., 1962, **20,** 273.

41. CARTIER P., CHEDRU J., TEMKINE H. — J. Physiol., 1964, **56,** 543.

42. CARTIER P., TEMKINE H., Atti Delle VII Giornate Biochimiche Latine, 1963, **81,** 1.

43. CHAPMAN R.G., HUENNEKENS F.M., GABRIO B.W. — Clin. Research, 1960, **8**, 127.

44. CHAPMAN R.G., HENNESSEY M.A., WALTERSDORPH A.M,. HUENNEKENS F.M., GABRIO B.W, — J. Clin. Invest., 1962, **41**, 1249.

45. CHEN P.S., JORGENSEN S. — Acta Pharmacol. et toxicol., 1957, **13**, 12.

46. CHRISTENSEN H.N., RIGGS T.R. — J. Biol. Chem., 1952, **194**, 57.

47. CHRISTENSEN H.N., JONES J.C. — Biochim. Biophys. Acta,. 1962, **59**, 355.

48. CLARKSON E.M., MAIZELS M. — J. Physiol., 1952, **116**, 112.

49. CLARKSON T.W., ROTHSTEIN A., CROSS A. — Am. J. Physiol., 1961, **200**, 781.

50. CLUTTERBUCK R.W. — Biochem. J., 1928, **22**, 1193.

51. COOK. G.M.W., HEARD D.H., SEAMAN G.V.F. — Nature, 1961, **191**, 44.

52. CORSINI F., MANFREDI G., PINTOZZI P. — Clin. Pediatr. Ital., 1959, **41**, 279.

53. CRANE R.K., LIPMAN F. — J. Biol. Chem., 1953, **201**, 235.

54. CRANE R.K., SOLS A. — J. Biol. Chem., 1953, **203**, 273.

55. CRANE R.K., — Sciences, 1958, **127**, 285.

56. DAJANI R.M., ORTEN J.M. — J. Biol. Chem., 1958, **231**, 913.

57. DANIELLI J.F. — Recent developments in cell physiology 1954 (J.A. Kitchinged) Acad. Press. N.Y.

58. DAVSON H., DANIELLI J.F. — " The permeability of natural membranes " Cambridge University Press. 1943.

59. DAWSON R.M.C., HEMINGTON N., LINDSAY D. — Biochem. J., 1960, **77**, 226.

60. DE GIER J., VAN DEENEN L.L. — Biochim. Biophys. Acta., 1961, **49**, 286.

61. DICKENS F. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, **75**, 71.

62. DISCHE Z. — Enzymologia, 1937, **1**, 288.

63. DISCHE Z. — Naturwiss, 1938, **26,** 252.

64. DISCHE Z. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1941, **23,** 1140.

65. DODGE J.T., MITCHELL C., HANAHAN D.J. — Arch. Biochem. Biophys., 1963, **100**, 119.

66. DOUGHERTY R.M., HARRIS R.J.C. — Nature, 1962, **194,** 1116.

67. DOUSTE - BLAZY L. — Exp. Ann. Biochim. Med., 1959, **21,** 187.

68. DRABKIN D., ROUGHTON F.J.W., KENDREW J.C., " Hemoglobin " Butterworths Scientific Publications, London 1949.

68bis. DUNKER E., PASSOW H., — Pflügers Arch., 1953, 256, 446.

69. EISENMAN A.J., OTT. L., SMITH P.K., WINKLER A.W. — J. Biol. Chem., 1940, **135,** 165.

70. ERICKSON B.N., BERNSTEIN S.S., ARVIN I., JONES R.L., MACY I.G. — J. Biol. Chem., 1938, **122,** 515.

71. EVANS J.P., WELDRON J.M., OLEKSYSHYN N.L. — J. Biol. Chem., 1956, **218**, 255.

72. EYLAR E.H., MADOFF M.A., BRODY O.V., ONCLEY J.L., — J. Biol. Chem., 1962, **237,** 1992.

73. FARQUHAR J.W. — Biochim. Biophys. Acta, 1962, **60,** 80.

74. FEHER T., MATKOVICS B. — Nature, 1960, **187**, 701.

75. FISKE C., SUBBAROW Y. — J. Biol. chem., 1925, **66**, 375.

76. FITZSIMONS E.J., SENDROY J. — J. Biol. Chem., 1961, **236**, 1595.

77. GABRIO B.W., FINCH C.A. — J. Clin. Invest., 1954, **33**, 242.

78. GABRIO B.W., HENNESSEY M., THOMASSON J., FINCH C.A. — J. Biol. Chem., 1955, **215**, 357.

79. GABRIO B.W., DONOHUE D.M., FINCH C.A. — J. Clin. Invest., 1955, **34,** 1509.

80. GARDOS G. — Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1953, **6,** 191.

81. GARDOS G. — Biochim. Biophys. Acta., 1958, **30,** 653.

82. GERLACH E., FLECKENSTEIN A., GROSSE E. — Pflügers Arch., 1958, **266,** 528.

83. GERLACH E., LUBBEN K. — Pflügers Arch., 1959, **269,** 520.

84. GLYNN I.M. — J. Physiol., 1956, **134,** 278.

85. GLYNN I.M. — Prog. in Biophys. and Biochem., 1957, **8**, 243.

86. GOLDSTEIN D.A., SOLOMON A.K. — J. Gen. physiol., 1960, **44**, 1.

87. GOURLEY D.R.H., GEMMILL L.L. — J. cel. and comp. physiol., 1950, **35**, 341.

88. GOURLEY D.R.H. — Am. J. Physiol., 1951, **164**, 213.

89. GOURLEY D.R.H. — Arch. Biochem., Biophys., 1952, **40**, 1.

90. GOURLEY D.R.H. — Arch. Biochem. Biophys., 1952, **40**, 13.

91. GOURLEY D.R.H., MATSCHINER J.T. — J. cell. comp. physiol., 1953, **41**, 225.

92. GOURLEY D.R.H. — Virginia J. Sci., 1954, **5**, 20.

93. GOURLEY D.R.H. — Am. J. Physiol. 1957, **190**, 536.

94. GREEN D.E., FLEISCHER S. — Biochim. Biophys. Acta., 1963, **70**, 554.

95. GRIGNANI F. LOHR G.W. — Klin. Wochschr. 1960, **38**, 796.

96. GRISOLIA S. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, **72**, 462.

97. GROSS R.T., HURWITZ R.E., MARKS P.A. — J. Clin. Invest., 1958, **37**, 1176.

98. GUEST G.M., RAPOPORT S. — Physiol. Reviews, 1941, **21**, 410.

99. HAHN L., HEVESY G. — Acta Physiol. Scand., 1942, **16**, 193.

100. HALPERN L. — J. Biol. Chem., 1936, **114**, 747.

101. HANAHAN D.J., WATTS R.M., PAPPAJOHN D. — J. Lipid. Research., 1960, **1**, 421.

102. HARRIS I.M., PRANKERD T.A.J., WESTERMAN M.P. — Brit. M.J. 1957, **2**, 1276.

103. HARRIS E.J., PRANKERD T.A.J. — Experientia, 1958, **14**, 249.

104. HARRIS E.J. — « Transport and accumulation in biological systems « London. Butterworths scientific publications 1960.

105. HARROP G.A. — Arch. Int. med., 1919, **23**, 745.

106. HARROP G.A., BARRON E.S.G. — J. exper. med., 1928, **48**, 207.

107. HASHIMOTO T., ISHII, Y., TATIBANA M., YOSHIKAWA H. —

J. Of Biochem., 1961, **50**, 471.

108. HASHIMOTO T., YOSHIKAWA H. — Biochem. Biophys. Research Communs, 1961, **5**, 71.

109. HELLER P., WEINSTEIN H.G., WEST M., ZIMERMAN H.J. — Ann. Intern. Med., 1960, **53**, 898.

110. HELLER P., WEINSTEIN H.G., WEST M., ZIMERMAN H.J. — J. Lab. Clin. Med., 1960, **55**, 425.

111. HOKIN L.E., HOKIN M.R. — Nature 1959, **184**, 1068.

112. HOKIN L.E., HOKIN M.R. — Nature, 1961, **189**, 836.

113. HUENNEKENS F.M., NURK E., GABRIO B.W. — J. Biol. Chem., 1956, **221**, 971.

114. HUENNEKENS F.M., LIU L., MYERS H.A.P., GABRIO B.W. — J. Biol. Chem., 1957, **227**, 253.

115. HUNTER A.S., HUNTER F.R. — J. Cell. Comp. Physiol., 1957, **49**, 479.

116. IVERSEN P. — Biochem. Z., 1921, **114**, 297.

117. JONAS H., GOURLEY D.R.H. — Biochim. Biophys. Acta, 1954, **14**, 335.

118. JONES N., ROBINSON M. — J. Clin. Path., 1957, **10**, 191.

119. JORGENSEN S. — Acta Pharmacol. et Toxicol., 1957, **13**, 102.

120. JORPES E. — Biochem. J., 1932, **26**, 1488.

121. JUDAH J.D., AHMED K. — Biochim. Biophys. Acta., 1963, **71**, 34.

122. KAHN J.B. — J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1957, **120**, 239.

123. KASHKET S., RUBINSTEIN D., DENSTEDT O.F., GOSSELIN S.M. — Canad. J. Biochem. and Physiol., 1957, **35**, 827.

124. KATES M., ALLISON A.C., JAMES A.T. — Biochim. Biophys. Acta, 1961, **48**, 571.

125. KAVANAU J.L. — Nature 1963, **198**, 525.

126. KEHOE R.A., CHOLAK J., STORY R.V. — J. Nutrition, 1940, **19**, 579.

127. KIESE M. — Biochem. Z., 1944, **316**, 264.

128. KIRKMAN H.N. — Nature, 1959, **184**, 1291.

129. KLENK E., RENNKAMP F., — Z. Physiol. Chem., 1942, **273,** 253.

130. KLENK E., STOFFEL W. — Z. Physiol. Chem., 1956, **303,** 78.

131. KLENK E., LEMPFRID H. — Z. Physiol. Chem., 1957, **307,** 278.

132. KLENK E., UHLENBRUCK G. — Z. Physiol. Chem., 1958, **311,** 227.

133. KLIBANSKY C., OSIMI Z. — Bull. Res. Counc. of Israel, 1961, **9,** 143.

134. KOLOTILOVA A.I. — Chem. Abstr., 1952, **46,** 4093.

135. KREBS H.A., HENSELEIT K. — Z. Physiol. Chem., 1932, **210,** 33.

136. KREBS H., HEMS R. — Biochem. J., 1952, **52,** 156.

137. KREBS H., HEMS R. — Biochim. Biophys. Acta, 1953, **12,** 172.

138. LAITY J.L.H. — Biochem. J., 1959, **71,** 528.

139. LE PAGE G.A. — Cancer Res., 1950, **10,** 77.

140. LOECKER W.C.J., PRANKERD T.A.J. — Clin. Chim. Acta, 1961, **6,** 641.

141. LOHR G.W., WALLER H.D., KARGES O. — Klin. Wochschr, 1957, **35,** 871.

142. LOHR G.W., WALLER H.D., KARGES O., SCHLEGEL B., MULLER A.A. — Klin. Wochschr., 1958, **36,** 1008.

143. LOHR G.W., WALLER H.D. — Klin. Wochschr., 1959, **37,** 833.

144. LOHR G.W., WALLER H.D. — Dtsch. med. Wschr., 1961, **86,** 27.

145. LOVELOCK J.E. — Biochem. J., 1955, **60,** 629.

146. LOWY B.A., JAFFE E.R., VANDERHOFF G.A., CROOK L., LONDON I.M. — J. Biol. Chem., 1958, **230,** 409.

147. LUCKNER H. — Arch. Ges. Physiol. 1939, **241,** 753.

148. MACHO L. — Nature, 1957, **180,** 1351.

149. MAIZELS M. — Quater. J. Exptl. Physiol., 1946, **33,** 129.

150. MAIZELS M. — J. Physiol., 1951, **112,** 59.

151. MANDEL P., CHAMBON P. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, **41,** 989.

152. MANYAI S., VARADY Z. — Acta physiol. Acad. Sci. Hung., 1958, **14**, 103.

153. MARKS P.A., JOHNSON A.B., HIRSCHBERG E., BANKS J. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, **75**, 95.

154. MARTIN J., DOTY D. — Anal. Chem., 1949, **21**, 963.

155. MARTLAND M. — Biochem. J., 1925, **19**, 117.

156. MATHIAS P.J., SHEPPARD C.W. — Proc. Soc. Exptl. Biol. med., 1954, **86**, 69.

157. MICHAELIS L., SALOMON K. — J. Gen. Physiol., 1930, **13**, 683.

158. MILLS G.C., SUMMERS L.B. — Arch. Biochim. Biophys., 1959, **84**, 7.

159. MITCHISON J.B. — J. Exp. Biol., 1953, **30**, 397.

160. MOLLISON P.L., ROBINSON M.A., HUNTER D.A. — Lancet, 1958, **1**, 766.

161. MORRISON W.C., NEURATH H. — J. Biol. Chem., 1953, **200**, 39.

162. MORTIMER D. — Canad. J. Chem., 1952, **30**, 653.

163. MOSKOWITZ M., CALVIN M. — Exp. cell. Res. 1952, **3**, 33.

164. MUELLER C., HASTINGS A. — J. Biol. Chem., 1951, **189**, 869.

165. MUELLER C., HASTINGS A. — J. Biol. Chem., 1951, **189**, 881.

166. MURPHY J.R. — J. Lab. Clin. med., 1960, **55**, 286.

167. NAKAO M., NAKAO T., YAMAZOE S. — Nature, 1960, **187**, 945.

168. NAKAO M., NAKAO T., YAMAZOE S., YOSHIKAWA H. — J. Biochem. Jap., 1961, **49**, 487.

169. NOLTMANN E., BRUNS F.H. — Z. Physiol. Chem., 1958, **313**, 194.

170. NOSSAL P.M. — Austral. J. exptl. Biol. med. Sci., 1948, **26**, 123, 531, 553.

171. OCKERMAN P.A. — Biochim. Biophys. Acta, 1963, **74**, 588.

172. OHNISHI T., OHNISHI T. — J. Biochem., 1962, **51**, 380.

173. OHNISHI T. OHNISHI T. — J. Biochem., 1962, **52**, 207, 230.

174. OVERGAARD-HANSEN K., JORGENSEN S., PROETORIUS F. — Nature, 1957, **179**, 152.

175. OVERGAARD-HANSEN K., JORGENSEN S. — Scandinav. J. Clin. Lab. Investigation, 1960, **12**, 10.

176. PAGANELLI C.V., SOLOMON A.K. — J. Gen. Physiol., 1957, **41**, 259.

177. PAIXAO L.M., YOE J.H. — Clin. Chim. Acta, 1959, **4**, 507.

178. PALADINI A.C., LELOIR L.F. — Biochem. J., 1952, **51**, 426.

179. PAPPIUS H.M., ANDREAE S.R., WOODFORD V.R., DENSTEDT O.F. — Canad. J. of Biochem. and Physiol. 1954, **32**, 271.

180. PARK C.R. — « Membrane transport and metabolism ». Edit. Kleinzeller. A. Kotyk A. Academic Press. London and New York.

181. PARPART A.K., BALLENTINE R. — Trends in physiology and biochemistry 1952, 135.

182. PASSOW H. — Abstracts of Communications to XXth Int. Physiol. Cong. Brussels, 1956.

183. PAYSANT-DIAMENT M., POLONOWSKI J. — Bull. Soc. Ch. Biol., 1960, **42**, 337.

184. PETHIYAGODA U. — Nature, 1961, **192**, 452.

185. PHILIPPOT J. — Thèse doctorat Sciences physiques. Paris 1962.

186. PONDER E. — Haemolysis and related phenomena 1948 (Grune et Statton N.Y.).

187. PONDER E. — Blood, 1954, **9**, 227.

188. PRANKERD T.A.J., ALTMAN K.I. — Biochem. J., 1954, **58**, 622.

189. PREISS J., HANDLER P. — J. Biol. Chem., 1957, **225**, 759.

190. QUASTEL J.H., WHEATLEY A.H. — Biochem. J., 1931, **25**, 117.

191. QUASTEL J.H., WHEATLEY A.H. — Biochem. J., 1938, **32**, 93.

192. RAKER J.W., TAYLOR I.M., WELLER J.M., HASTINGS A.B. — J. Gen. Physiol., 1950, **33**, 691.

193. RALL T.W., LEHNINGER A.L. — J. Biol. Chem., 1952, **194**, 119.

194. RAPOPORT S., GUEST G.M. — J. Biol. Chem., 1939, **131**, 675.

195. RAPOPORT S., GUEST G.M. — J. Biol. Chem., 1941, **138,** 269.

196. RAPOPORT S., LUEBERING J. — J. Biol. Chem., 1950, **183,** 507.

197. RAPOPORT S., LUEBERING J. — J. Biol. Chem., 1951, **189,** 683.

198. RAPOPORT S., LUEBERING J. — J. Biol. Chem., 1952, **196,** 583.

199. RAPOPORT S., NIERADT C. — Biochem. Z., 1955, **326,** 231.

200. RAPOPORT S., HINTERBERGER U., HOFMANN E. — Naturwiss., 1961, **48,** 501.

201. REED C.F., SWISHER S.N., MARINETTI G.V., EDEN E.G. — J. Lab. Clin. Med., 1960, **56,** 281.

202. RICHMOND J.E., HASTINGS A.B. — Am. J. of Physiol., 1960, **199,** 821.

203. ROBERTSON J.D. — Progr. Biophys., 1960, **10,** 343.

204. ROHDEWALD M., WEBER M. — Z. Physiol. Chem., 1956, **306,** 90.

205. ROSE I.A., O'CONNELL E.L. — J. Biol. Chem., 1964, **239,** 12.

206. ROSE I.A., WARMS J.V.B., O'CONNELL E.L. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, **15,** 33.

207. RUBENSTEIN D. — Thèse Ph. D. Dept. Biochim. Universite Mc Gill, 1952, 53.

208. RUMMEL W., PFLEGER K., SEITEN E. — Biochem. Z., 1958, **330,** 310.

209. SCHEUCH D., KAHRIG C., OCKEL E., WAGENKNECHT C., RAPOPORT S.H. — Nature, 1961, **190,** 631.

210. SCHWEIGER H.G. — Intern. Rev. Pytol. U.S.A., 1962, **13,** 135.

211. SEAMAN G.V.F., UHLENBRUCK G. — Biochim. Biophys. Acta, 1962, **64,** 570.

212. SEAMAN G.V.F., UHLENBRUCK G. — Arch. Biochem. Biophys., 1963, **100,** 493.

213. SHRAGO E., FALCONE A.B. — Biochim. Biophys. Acta, 1963, **73,** 7.

214. SKAUG O.E., NATVIG R.A. — Scand. J. Clin. et Lab. Invest., 1957, **9**, 39.

215. SKOU J.C. — Biochim. Biophys. Acta, 1957, **23**, 394.

216. SKOU J.C. — Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 6.

217. SOLOMON A.K. — Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958, **185**, 175.

218. SOLOMON A.K. — J. Gen. Physiol., 1960, **43**, 1.

219. SOLVONUK P.F., COLLIER H.B. — Canad. J. Biochem. and Physiol. 1955, **33**, 38.

220. SPICER S.S., CLARK A.M. — J. Biol. Chem., 1949, **179**, 987.

221. STERN K.G., REINER M., SILBER R.H. — J. Biol. Chem., 1945, **161**, 731.

222. STROMME J.H., ELDJARN L. — Biochem. J., 1962, **84**, 406.

223. SZEINBERG A., MARKS P.A. — J. of Clin. Invest. 1961, **40**, 914.

224. TATIBANA M., MIYAMOTO K., ODAKA T., NAKAO M. — J. Bioch. Jap., 1960, **48**, 685.

225. TEMKINE H. — Thèse doctorat en médecine Paris, 1963.

226. THRELFALL C. — Biochem. J., 1957, **65**, 694.

227. TIMM K. — Arch. Physiol., 1937-8, **239**, 286.

228. TOSTESON O.C. — Acta Physiol. Scand., 1959, **46**, 19.

229. TSUBOI K.K., HUDSON P.B. — Arch. Biochem. Biophys., 1953, **43**, 339.

230. TSUBOI K.K. — Arch. Biochem. Biophys., 1959, **83**, 445.

231. VALBERG L.E., HOLT J.M., SZIVEK J. — Analytical Chemistry, 1964, **36**, 790.

232. Van SLYKE D.D., WU H., McLEAN F.C. — J. Biol. Chem., 1923, **56**, 765.

233. VESTERGAARD BOGIND B., HESSELBO T. — Biochim. Biophys. Acta, 1960, **44**, 117.

234. VESTERGAARD BOGIND B. — Biochim. Biophys. Acta, 1963, **66**, 93.

235. VISCHER E. ,CHARGAFF E. — J. Biol. Chem., 1948, **176**, 703.

236. WALLACH S., ZEMP J.W., CAVINS J.A., JENKINS L.J., BETHEA M., FRESHETTE L., HAYNES L.L., TULLIS J.L., Blood 1962, — **20,** 344.

237. WARBURG O. — Z. Physiol. Chem. 1909, **59,** 112.

238. WARBURG O., KUBOWITZ F., CHRISTIAN W. — Biochem. Z., 1930, **227,** 245.

239. WARBURG O., CHRISTIAN W. — Biochem. Z., 1939, **303,** 40.

240. WAUGH D.F., SCHMITT F.O. — Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1940, **8,** 233.

241. WENDEL W.B. — J. Biol. Chem., 1933, 102, 373.

242. WHITTAM R. — J. Physiol., 1958, **140,** 479.

243. WHITTAM R. — « Transport and diffusion in red blood cells » London, Edward Arnold (Publishers) L T D, 1964.

244. WHITTEMBURY G., SUGINO N., SOLOMON A.K. — Nature, 1960, **187,** 699.

245. WILBRANDT W. — Pflüg. Arch. Ges. Physiol., 1940, **243,** 519.

246. WILLIAMS H.H., ERICKSON B.N., MACY I.G. — Quart. Rev. Biol. 1941, 16, 80.

247. WINKLER K.C., BUNGENBERG DE JONG H.G. — Arch. Neerl. Physiol., 1940, 41, **25,** 431.

248. YAMAKAWA T., SUZUKI S. — J. Biochem., 1951, **38,** 199.

249. YAMAKAWA T., SUZUKI S. — J. Biochem., 1952, **39,** 393.

250. YOSHIKAWA H., NAKAO M., MIYAMOTO K., YANAGISSAWA I. — J. Biol. Chem., 1959, **46,** 83.

251 YOSHIKAWA H., NAKAO M., MIYAMOTO K., TATIBANA M. — The Journ. of Bioch., 1960, 47, 635.

252. YOUNG D. A.B. — Biochim. Biophys. Acta, 1964, 90, 178.

253. ZIPURSKY A., ISRAELS L.G. — Nature, 1961, 189, 1013.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Calcium et mitochondries

Vu et approuvé :

Paris, le 23 Avril 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

SOCIPE
PARIS
NORD 61-55
5525